

**DER SPEZIFISCHE HERZGLYKOSIDREZEPTOR
DES SCHAFHERZENS**

Vergleich von Ventrikelmyokard und Purkinjefasern

EUGEN HUG

1987

Aus der Medizinischen Klinik I
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Klinikum Großhadern

Vorstand : Professor Dr. med. G. Riecker

DER SPEZIFISCHE HERZGLYKOSIDREZEPTOR DES

SCHAFHERZENS

Vergleich von Ventrikelmyokard und

Purkinjefasern

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

EUGEN HUG

aus München

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Erdmann
	Prof. Dr. G. Paumgartner
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. G. Riecker
	Prof. Dr. W. Forth
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. Lindsay Brown
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	12. 3. 1987

I.	Einleitung	1
II.	Die Geschichte der Philosophie	2
III.	Die Geschichte der Naturwissenschaften	3
IV.	Die Geschichte der Literatur	4
V.	Die Geschichte der Kunst	5
VI.	Die Geschichte der Religion	6
VII.	Die Geschichte der Politik	7
VIII.	Die Geschichte der Philosophie	8
IX.	Die Geschichte der Naturwissenschaften	9
X.	Die Geschichte der Literatur	10
XI.	Die Geschichte der Kunst	11
XII.	Die Geschichte der Religion	12
XIII.	Die Geschichte der Politik	13
XIV.	Die Geschichte der Philosophie	14
XV.	Die Geschichte der Naturwissenschaften	15
XVI.	Die Geschichte der Literatur	16
XVII.	Die Geschichte der Kunst	17
XVIII.	Die Geschichte der Religion	18
XIX.	Die Geschichte der Politik	19
XX.	Die Geschichte der Philosophie	20
XXI.	Die Geschichte der Naturwissenschaften	21
XXII.	Die Geschichte der Literatur	22
XXIII.	Die Geschichte der Kunst	23
XXIV.	Die Geschichte der Religion	24
XXV.	Die Geschichte der Politik	25
XXVI.	Die Geschichte der Philosophie	26
XXVII.	Die Geschichte der Naturwissenschaften	27
XXVIII.	Die Geschichte der Literatur	28
XXIX.	Die Geschichte der Kunst	29
XXX.	Die Geschichte der Religion	30
XXXI.	Die Geschichte der Politik	31
XXXII.	Die Geschichte der Philosophie	32
XXXIII.	Die Geschichte der Naturwissenschaften	33
XXXIV.	Die Geschichte der Literatur	34
XXXV.	Die Geschichte der Kunst	35
XXXVI.	Die Geschichte der Religion	36
XXXVII.	Die Geschichte der Politik	37
XXXVIII.	Die Geschichte der Philosophie	38
XXXIX.	Die Geschichte der Naturwissenschaften	39
XL.	Die Geschichte der Literatur	40
XLI.	Die Geschichte der Kunst	41
XLII.	Die Geschichte der Religion	42
XLIII.	Die Geschichte der Politik	43
XLIV.	Die Geschichte der Philosophie	44
XLV.	Die Geschichte der Naturwissenschaften	45
XLVI.	Die Geschichte der Literatur	46
XLVII.	Die Geschichte der Kunst	47
XLVIII.	Die Geschichte der Religion	48
XLIX.	Die Geschichte der Politik	49
L.	Die Geschichte der Philosophie	50



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554605_0001

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Anmerkungen zur Therapie mit Herzglykosiden	1
1.2. Das $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-System	3
1.3. Der Wirkungsmechanismus von Herzglykosiden	6
1.4. Formen der Herzglykosid-Intoxikation	9
1.5. Fragestellung der vorliegenden Arbeit	14
2. Materialien und Methoden	16
2.1. Materialien	16
2.2. Methoden	16
2.2.1. Statistische Analyse	16
2.2.2. Proteinbestimmung	17
2.2.3. Messung der Aktivität der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase in Membranpräparationen	17
2.3. Untersuchungen an Zellmembranhomogenaten	19
2.3.1. Präparation und Isolierung von Herzmuskel- zellmembranen	19
2.3.2. Präparation von Gewebehomogenaten aus unter- schiedlichen Anteilen des Schafherzens	21
2.3.3. (^3H) -g-Strophanthin-Bindung an Zellmembran- homogenate - Versuchsaufbau - Prinzip der raschen Filtration - Bestimmung der protein- gebundenen Radioaktivität	22
2.3.4. Bestimmung von spezifischer und unspezifischer Bindung	23
2.3.5. Bestimmung der maximalen (^3H) -g-Strophanthin- Radioaktivität pro Reaktionsansatz	24
2.3.6. Zeitabhängige Assoziation von (^3H) -g- Strophanthin an den Rezeptor	24
2.3.7. g-Strophanthin-konzentrationsabhängige (^3H) -g-Strophanthin-Bindung	24

2.3.8.	Zeitabhängige Dissoziation von (^3H)-g-Strophanthin von dem Rezeptor	25
2.3.8.1.	Herstellung und Isolierung des (^3H)-g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes	26
2.3.8.2.	Messung der Dissoziation der (^3H)-g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexe	27
2.3.9.	Mg^{2+} , ATP und Na^{+} -unterstützte (^3H)-g-Strophanthin-Bindung	27
2.4.	Untersuchungen an elektrisch stimulierten, schlagenden Purkinjefasern und an Moderatorbandstreifen des Schafherzens	28
2.4.1.	Präparation der Gewebe	28
2.4.2.	Versuchsanordnung zur Messung von Kontraktionskraft bei elektrischer Stimulation	32
2.4.3.	Bestimmung des Feuchtgewichtes	33
2.4.4.	Definition der g-Strophanthin-Intoxikation am schlagenden Präparat	33
2.4.5.	Messung von (^3H)-g-Strophanthin-Bindung und glykosidkonzentrationsabhängiger Kontraktionskraft	33
2.4.5.1.	Definition der unspezifischen Bindung von (^3H)-g-Strophanthin	34
2.4.5.2.	Bestimmung der (^3H)-g-Strophanthin-Radioaktivität im Inkubationsmedium	35
2.4.6.	Messung der zeitabhängigen $^{86}\text{Rb}^{+}$ -Aufnahme	35
2.4.6.1.	Bestimmung der zeitabhängigen, gesamten $^{86}\text{Rb}^{+}$ -Aufnahme	35
2.4.6.2.	Bestimmung der zeitabhängigen, unspezifischen $^{86}\text{Rb}^{+}$ -Aufnahme	36
2.4.6.3.	Bestimmung der zeitabhängigen, spezifischen $^{86}\text{Rb}^{+}$ -Aufnahme	37
2.4.6.4.	Messung der $^{86}\text{Rb}^{+}$ -Radioaktivität im Inkubationsmedium	37
2.4.7.	Messung der g-Strophanthin-konzentrationsabhängigen $^{86}\text{Rb}^{+}$ -Aufnahme	37

	Seite
3. Resultate	39
3.1. (³ H)-g-Strophanthin-Bindung an isolierte Zellmembranen des Schafmyokards	39
3.1.1. Vorbemerkung	39
3.1.2. Grundlagen der Substrat-Rezeptor-Reaktion	42
3.1.3. Zeitabhängige (³ H)-g-Strophanthin-Bindung	45
3.1.4. Kinetische Konstanten der (³ H)-g-Strophanthin-Bindung an isolierte Zellmembranen	48
3.1.4.1. Temperaturabhängige Assoziationsgeschwindigkeitskonstante, k_{+1}	48
3.1.4.2. Temperaturabhängige Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante, k_{-1}	49
3.1.5. Konzentrationsabhängige (³ H)-g-Strophanthin-Bindung - temperaturabhängige Dissoziationskonstante, K_D	53
3.1.6. Konzentrationsabhängige (³ H)-g-Strophanthin-Bindung - Vergleich der Analysemethoden von Scatchard, Woolf und Hill	58
3.1.7. Dissoziations- und kinetische Konstanten - Einfluß eines Mg^{2+} , ATP und Na^+ -haltigen Mediums	63
3.1.8. Thermodynamik der g-Strophanthin-Bindungsreaktion - Bestimmung von Gleichgewichtszustand und Übergangsphase	64
3.1.9. Effekt der (³ H)-g-Strophanthin-Bindung auf die $(Na^+ + K^+)$ -ATPase-Aktivität	74
3.2. (³ H)-g-Strophanthin-Bindung an Homogenate aus Purkinjefasern und aus Arbeitsmyokard	77
3.2.1. Gleichgewichtskonstanten, kinetische Konstanten und Anzahl der Bindungsstellen	77
3.2.2. Einfluß von Kalium auf die (³ H)-g-Strophanthin-Bindung	92
3.2.3. Wirkung unterschiedlicher, unmarkierter Herzglykoside auf die (³ H)-g-Strophanthin-Bindung	102

3.3.	(^3H)-g-Strophanthin-Bindung und konzentrationsabhängige Wirkungen auf die Kontraktilität an elektrisch stimulierten, schlagenden Purkinjefasern und Moderatorbandstreifen	110
3.3.1.	Vorbemerkung	110
3.3.2.	Zeitabhängigkeit und Konzentrationsabhängigkeit der Wirkungen von g-Strophanthin auf die Kontraktionskraft	114
3.3.3.	Konzentrationsabhängige (^3H)-g-Strophanthin-Bindung - Bestimmung der Dissoziationskonstanten, K_D , und der Anzahl der Bindungsstellen	125
3.4.	$^{86}\text{RB}^+$ -Aufnahme in elektrisch stimulierte, schlagende Purkinjefasern und Moderatorbandstreifen - ein Meßparameter des transmembranösen Ionentransportes	131
3.4.1.	Vorbemerkung	131
3.4.2.	Zeitabhängigkeit der $^{86}\text{RB}^+$ -Aufnahme	133
3.4.3.	g-Strophanthin-konzentrationsabhängige $^{86}\text{RB}^+$ -Aufnahme	136
3.5.	Einfluß von L-Propranolol auf die g-Strophanthin-Wirkung an schlagenden Purkinjefasern	139
4.	Diskussion	141
4.1.	Der Herzglykosidrezeptor des Schafherzens	141
4.2.	Die Glykosid-Rezeptor-Bindungsreaktion	147
4.3.	Vergleich von Reizleitungssystem und Ventrikelmuskulatur	149
4.3.1.	Das Gewebehomogenat	149
4.3.1.1.	Der Kalium-Effekt	151
4.3.1.2.	Wirkung unterschiedlicher Herzglykoside	152
4.3.2.	Untersuchungen am elektrisch stimulierten, schlagenden Gewebe	158

5.	Zusammenfassung	173
6.	Literaturverzeichnis	176
7.	Lebenslauf	201

1. EINLEITUNG

1.1. Anmerkungen zur Therapie mit Herzglykosiden

"Ja, es ist ein Spezifikum. Und ich bin froh, daß die Digitalis hier bei Ihnen mal wieder zeigt, was sie kann."

Als Theodor Fontane in seinem Zeitroman "Der Stechlin" - verfaßt in den Jahren 1895/96 - den Kreisphysikus Dr. Sponholz diese Worte zu dem alten Herrn von Stechlin sprechen ließ, waren etwas mehr als 100 Jahre vergangen, seit der Engländer William Withering mit der Monographie "An Account of the Foxglove and its Medical Uses" Digitalis als Therapie der Wassersucht eingeführt hatte (263).

Zehn Jahre lang hatte der Arzt aus Birmingham seine Patienten beobachtet, exakte Dosierungsschemata der Fingerhutextrakte aufgestellt, die Nebenwirkungen aufgezeichnet und obwohl ihm nach dem damaligen ärztlichen Wissensstand der Kausalzusammenhang von Wassersucht und hydropischer Herzinsuffizienz nicht hinreichend bewußt sein konnte, schrieb er in den Schlußfolgerungen: "It has a power over the motion of the heart to a degree yet unobserved in any medicine, and this power may be converted to salutary ends."

Im 19. Jahrhundert - der Zeit Fontanes - ging das Wissen um die notwendige Sorgfalt im Umgang mit dieser Substanz teilweise verloren und Digitalis wurde auf Grund seiner heftigen, toxischen Nebenwirkungen infolge ständiger Überdosierung zurückhaltend verwendet (106).

Die Ära der modernen Herzglykosid-Therapie beginnt um die Jahrhundertwende und erreichte in der klinischen Einführung der kristallinen Reinglykoside in der Zeit um 1945 einen Höhepunkt (88).

Heute gehören Herzglykoside in der Bundesrepublik Deutschland zu den am häufigsten verschriebenen Arzneimitteln. Mit 4 Millionen Verschreibungen alleine im Jahre 1981 führt Deutschland die Gruppe der hochindustrialisierten, westlichen Länder an. (Im Vergleich: ca. 2 Mio in den U.S.A.; ca. 1/2 Mio in Großbritannien (207).)

Der häufige Gebrauch (bei nicht immer gesicherter Indikation) kann jedoch nicht darüber hinwegtäuschen, daß dieses Pharmakon wahrscheinlich bei einem Versuch einer Neuaufnahme in den Arzneimittelkatalog gegenwärtig keine Zulassung erhalten würde, da die klinische Problematik der geringen therapeutischen Breite auch 200 Jahre nach William Withering trotz aller Bemühungen nicht gelöst ist.

Die relativ häufig auftretenden, toxischen Nebenwirkungen der Glykoside, die im klinischen Alltag nur bedingt durch vorsichtige Dosierung - wie sie auch schon Withering empfahl - zu vermeiden sind, führten dazu, daß sich das Forschungsinteresse auf die Aufklärung des primären Angriffsortes von Herzglykosiden und ihres Wirkungsmechanismus am Herzen konzentrierte.

Von einer Vielzahl zellulärer und subzellulärer Kompartimente wurde angenommen, daß sie der erste Schritt der Glykosid-Interaktion seien (79, 90, 129, 255), doch erwies sich die transmembranöse ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase als das einzige System, an dem reproduzierbar und bei niedrigen Konzentrationen eine direkte Wirkung der Glykosid-Bindung feststellbar war.

Dies geht auf die Beobachtungen von Schatzmann (216), der an Erythrozyten ein durch Herzglykoside spezifisch hemmbares Na^+/K^+ -Transportsystem beschrieb, und auf Jens Christian Skou zurück, der 1957 (226) ein ATP-spaltendes Enzym entdeckte, welches außer Mg^{2+} noch K^+ - und Na^+ -Ionen zu seiner Aktivierung benötigte. Es folgten zahlreiche Untersuchungen, die eine Korrelation von Glykosid-Bindung und Hemmung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase demonstrierten, so daß die ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase bereits 1963 von Repke und Portius (199) als "Rezeptor-Enzym" für Herzglykoside bezeichnet wurde. Wird auch heute noch die Diskussion über den weiteren Wirkungsmechanismus von Herzglykosiden teilweise kontrovers geführt, so darf zumindest als gesichert angenommen werden, daß der primäre Angriffspunkt der Bindung von Herzglykosiden in der Beeinflussung der spezifischen ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität besteht (für Übersichtsartikel siehe: 76, 121, 236, 253).

1.2. Das $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-System

Der Einsatz neuester, technischer Methoden ermöglichte in den letzten Jahren entscheidende Erkenntnisse über Morphologie und Struktur des $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Moleküls.

1984 konnten Zampighi und Kyte (266) durch elektronenmikroskopische Studien nachweisen, daß es sich um ein ellipsoides Molekül handelt, das die Zellmembran durchspannt und bei einer Gesamtlänge von ca. 11,5 nm mit ca. 5 nm auf der cytoplasmatischen und ca. 2 nm auf der extrazellulären Seite aus der Zellmembran herausragt (147, 225).

Das Enzym besteht aus 2 Untereinheiten:

Einem großen, hydrophoben Protein - der α -Einheit - mit einem Molekulargewicht von ca. $110\,000 \pm 10\,000$ Dalton und einem kleineren Sialoprotein - der β -Einheit - von ca. $50\,000 \pm 5\,000$ Dalton Gewicht (49, 148, 164, 189).

Die enzymcharakteristischen Funktionen sind auf der katalytischen α -Einheit, die die Zellmembran durchspannt, lokalisiert; so zum Beispiel extrazellulär die Glykosid- und die K^+ -Bindungsstelle (212) und intrazellulär die ATP- und die Na^+ -Bindungsstelle (83), sowie das Phosphorylierungszentrum (22, 98, 114, 135).

Der β -Einheit konnte bisher noch keine Rolle im funktionalen Ablauf der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Reaktion zugeordnet werden, doch scheint diese Einheit zumindest für den Erhalt der Aktivität unverzichtbar (253).

In der Frage nach dem funktionsnotwendigen, stöchiometrischen Verhältnis der beiden Untereinheiten konnten Untersuchungen von Craig (50) Evidenz erbringen, daß die minimale Voraussetzung für ein aktives ATPase-Enzym bereits durch das einfache $\alpha\beta$ -Protomer erfüllt wird.

Das $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Molekül, das in vivo in der Zellmembran inkorporiert ist, besteht jedoch wahrscheinlich aus dem Dimer $\beta\alpha\beta$ (136, 149, 150).

Der molekulare Mechanismus des aktiven Kationentransportes, bei dem jeweils 3 Na^+ -Ionen aus der Zelle und 2 K^+ -Ionen in die Zelle transportiert werden, beruht anscheinend darauf, daß die katalytische Untereinheit in mindestens zwei verschiedenen

Konformationszuständen existiert und die Ionen während bzw. mit dem Konformationswechsel durch die Zellmembran geschleust werden (136, 150).

Der Forschungsgruppe um Arnold Schwartz gelang es kürzlich, die Aminosäure-Sequenz der katalytischen α -Einheit der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase von Schafsnieren zu entschlüsseln (224):

Demnach handelt es sich um ein Protein, bestehend aus 1 016 Aminosäuren (Abbildung 1) mit 8 transmembranösen Sequenzen (H1 bis H8).

Die g-Strophanthin-Bindungsstelle scheint durch die Aminosäuren Nr. 307 - 312 konstituiert zu werden, die als extrazelluläre, hydrophobe Sequenz die Bereiche H3 und H4 miteinander verbinden. Eventuell bestehen zwischen den aktiven ATPasen unterschiedlicher Spezies große Ähnlichkeiten, da ein Vergleich dieser α -Einheit mit der α -Einheit der $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -abhängigen ATPase des sarcoplasmatischen Reticulums aus Kaninchen-Muskel über weite Teile eine homologe Kodierung des sequentiellen Aminosäureaufbaues aufweist (170).

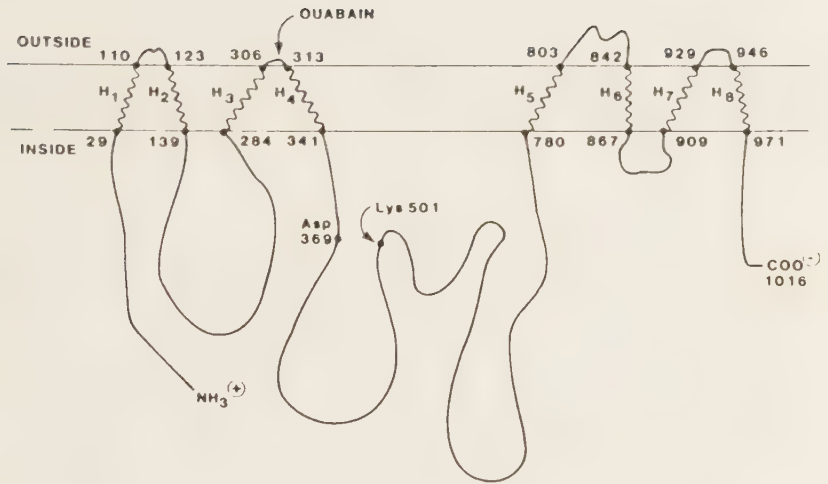


Abbildung 1:

Schematische Darstellung der katalytischen α -Einheit der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase von Schafsnieren.

Aus: Wallick et al. (254)

1.3. Der Wirkungsmechanismus von Herzglykosiden

Der Wirkungsmechanismus der Herzglykoside, der letztlich zum positiv inotropen Effekt führt, kann auch heute noch nicht als vollständig aufgeklärt angesehen werden.

Es hat sich jedoch ein Modell durchsetzen können, das die überwiegende Mehrzahl der Beobachtungen erklären kann und zu dem es gegenwärtig keine Alternative von ähnlicher Plausibilität gibt (5, 76, 156, 183).

Dieses Modell - in Abbildung 2 schematisch skizziert - postuliert folgende Einzelschritte:

- I. Der initiiierende Schritt besteht in der Bindung des Herzglykosides an den spezifischen Rezeptor mit daraus resultierender Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase.
- II. Die daraufhin ansteigende, intrazelluläre Natrium-Konzentration stimuliert den $(\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+})$ -Gegentransport.
Die Entdeckung dieses Transportsystems, das wahrscheinlich energieunabhängig 2 Na^+ -Ionen gegen 1 Ca^{2+} -Ion in beiden Richtungen elektroneutral austauscht (105), geht auf Versuche von Glitsch, Reuter und Scholz zurück (96), die bei Erhöhung der Na^+ -Konzentration eine Erhöhung des Ca^{2+} -Influx in Meerschweinchenvorhöfen fanden. Es konnte mehrfach nachgewiesen werden, daß der intrazelluläre Ca^{2+} -Gehalt unter Herzglykosiden tatsächlich erhöht ist (154, 155, 202).
- III. Der erhöhte Transport von Ca^{2+} in die Zelle führt zu einem Anstieg der Konzentration des freien, intrazellulären Ca^{2+} .
- IV. Dies bedeutet auch einen Anstieg des Ca^{2+} -Gehaltes im sarkoplasmatischen Reticulum und führt
- V. zu einer Freisetzung von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Reticulum in erhöhtem Maße während der Systole.
- VI. Eine erhöhte Ca^{2+} -Freisetzung bedeutet auch eine vermehrte elektromechanische Koppelung und damit eine erhöhte Kontraktion der Myofibrillen (4).

Bei der elektromechanischen Koppelung (Übersichtsartikel siehe 89), innerhalb derer Calcium das Bindeglied zwischen elektri-

scher Depolarisation der Zellmembran und mechanischer Kontraktion der Myofibrillen darstellt, bindet Calcium das Regulatorprotein Troponin, wodurch Tropomyosin - ebenfalls ein Regulatorprotein - das Myosin-Molekül freilegt (176); dessen kopfförmige Seitenfortsätze bilden sogenannte Brückenbindungen mit besonderen Stellen des Aktin-Moleküls aus, als deren Folge die beiden Filamenttypen unter Verbrauch von ATP teleskopartig ineinander verschoben werden (= "sliding filament theory") - es resultiert die Kontraktion (88).

Die Einzelschritte dieses Modells blieben nicht unwidersprochen. Von den vielen Einzelbeobachtungen sei an dieser Stelle nur erwähnt, daß zum Beispiel von einer Stimulation der Na^+/K^+ -Pumpe durch Herzglykoside berichtet wird (100, 200), und daß Lüllmann und Peters (168, 169) die erhöhte, intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration als Resultat einer Konformationsänderung (und nicht Hemmung) des ATPase-Moleküls durch Herzglykoside mit konsekutiver Konformationsänderung der Zellmembran und daraus folgender Freisetzung von Ca^{2+} ansehen.

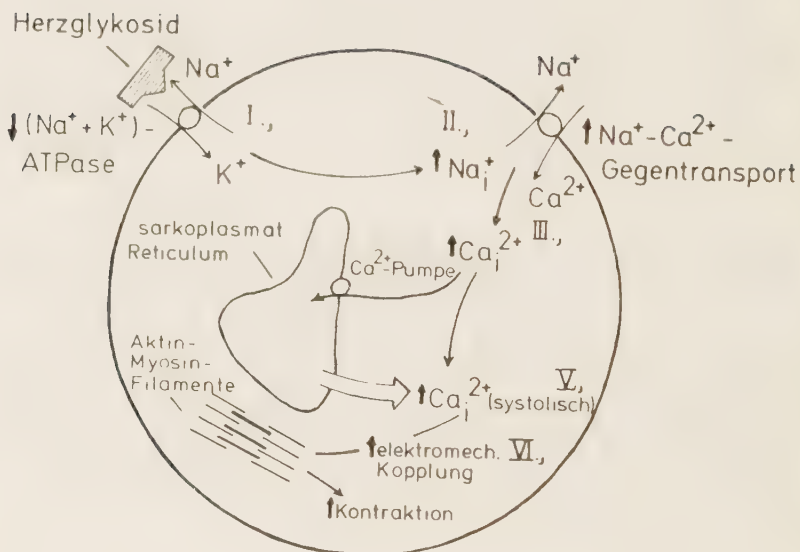


Abbildung 2:

Zellulärer Wirkungsmechanismus von Herzglykosiden (Modell).
 Nach: Glynn et al. (97) und Allen et al. (4)
 Modifiziert aus: Allen et al. (5)

1.4. Formen der Herzglykosid-Intoxikation

Auch durch große Anstrengungen - beispielsweise durch die Synthetisierung einer Vielzahl chemisch-struktural verschiedener, kardial wirksamer Glykoside (109) - ist es bisher nicht gelungen, die therapeutische Breite der Herzglykoside entscheidend zu erhöhen.

Diese geringe therapeutische Breite, die auf den geringen Konzentrationsabständen zwischen therapeutischem und toxischem Dosierungsbereich beruht - so führt bereits eine Verdoppelung der täglichen, oralen Erhaltungsdosis in etwa 70 % der Fälle zum Auftreten toxischer Wirkungen (88) - wird noch weiter eingeeengt durch die große Streubreite der individuellen Empfindlichkeit - vor allem auch des vorgeschädigten Herzens. Daraus erklärt sich, daß bei gesicherter Glykosidintoxikation die Serumglykosidkonzentrationen der Patienten im statistischen Mittel das 1,5- bis 3fache des therapeutischen Konzentrationsbereiches betragen (siehe Tabelle 1), vom Verteilungsspektrum her gesehen sich jedoch die Zonen des oberen therapeutischen und unteren toxischen Konzentrationsbereiches überlappen (157, 173, 227, 228).

Die Inzidenz toxischer Nebenwirkungen im Verlauf einer klinischen Glykosidtherapie beträgt in retro- und prospektiven Studien zwischen 7 % (230) und ca. 22 % (23, 60, 94, 134, 173).

Die Vergiftungssymptomatik der Herzglykoside umfaßt dabei:

- 1) Störungen der Herzrhythmik (ca. 95 %) (206)
- 2) Störungen des Gastro-Intestinal-Traktes (40 - 60 %)
- 3) Neurotoxische Wirkungen (10 - 15 %) (88)

Im Vordergrund der gastro-intestinalen Symptomatik stehen Appetitlosigkeit, Nausea und Erbrechen, die vorwiegend einer zentral-erregenden Wirkung auf die Chemorezeptor-Triggerzone (Area postrema) und nur in seltenen Fällen einer lokalen Reizwirkung im Magen-Darm-Trakt zuzuschreiben sind (162, 228).

Die neurotoxischen Wirkungen zeichnen sich vorwiegend durch Schwindelzustände, Kopfschmerzen, Krämpfe, Halluzinationen und Unruhe aus. Die oftmals beschriebene Xanthopsie tritt demgegenüber relativ selten auf (206).

Im Mittelpunkt der glykosidbedingten Nebenwirkungen stehen auf Grund ihrer Häufigkeit und klinischen Bedeutung die Störungen der Herzrhythmik:

Diese beruhen bei toxischen Konzentrationen überwiegend auf einer Verstärkung derjenigen elektrophysiologischer Glykosidwirkungen, welche - in geringerem Ausprägungsgrad - bereits im therapeutischen Wirkungsbereich beobachtet werden können und dort teilweise als erwünschter Effekt therapeutisch genutzt werden (zum Beispiel die verzögernde Wirkung auf die Erregungsleitung im AV-Knoten bei Vorhofflattern mit schneller Überleitung).

Da die unterschiedlichen Funktionen verschiedener Gewebearten des Herzens (Arbeitsmyokard mit Vorhöfen und Ventrikeln bzw. spezialisiertes Reizleitungssystem mit Schrittmacherzentren oder Überleitungsfunktionen) auf unterschiedlichen morphologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften basieren, differieren Effekte von Herzglykosiden mit ihrer Kombination aus direkten und indirekten - vorwiegend vagalen - Wirkungen auch in Abhängigkeit von dem jeweiligen Gewebe des Herzens (Tabelle 2).

Können Herzglykoside deshalb auch grundsätzlich jede Rhythmusstörung auslösen (Tabelle 1), so beruhen doch ca. 2/3 aller Arrhythmien auf ventrikulären Extrasystolen, wobei Bigemini und multifokale Extrasystolen als relativ charakteristisch gelten (173, 228). Der Übergang in ventrikuläre Tachykardie oder Kammerflimmern stellt eine - wenn auch seltene - so doch gefürchtete Komplikation der ventrikulären Arrhythmien dar (86, 157, 228).

Als Auslöser dieser ventrikulären Ektopien konnte - neben relativ seltenen reentry-Mechanismen - das periphere Reizleitungssystem, die Purkinjefasern, identifiziert werden:

An isolierten Purkinjefasern des Hundes konnten Rosen und Gelband (209, 210) mit steigenden Glykosidkonzentrationen typische Veränderungen an den durch elektrische Reizung ausgelösten Einzelpotentialen demonstrieren:

- 1.) Die Dauer des Aktionspotentials nimmt durch Verkürzung der Plateauphase (= Phase 2 des Aktionspotentials) ab.

- 2.) Das maximale, diastolische Potential sinkt bei höheren Glykosidkonzentrationen; parallel dazu nimmt auch die Steigung der Phase 0 bzw. die Leitungsgeschwindigkeit in der Faser ab.
- 3.) Die Steilheit der diastolischen Depolarisation (= Phase 4) nimmt zu, da es durch die Hemmung der Membranpumpe auf Grund der besonderen Stöchiometrie des aktiven Na^+/K^+ -Transportes zu einer Abnahme des basalen Ausstromes positiver Ladungen kommt.
- 4.) Bei toxischen Glykosidkonzentrationen treten im Verlauf der Depolarisation in Phase 4 verzögerte Nachpotentiale in Erscheinung als Folge rhythmischer Veränderungen des intrazellulären Calciums (= Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Reticulum während der Systole) und als Folge damit verbundener, synchroner Schwankungen der Na^+ -Permeabilität.

Die verzögerten Nachpotentiale können bei Erreichen des Schwellenwertes eine oder mehrere Systolen verursachen; sie haben die Tendenz, repetitive Aktionspotentiale auszulösen und werden als Grundmechanismus salvenartig auftretender Kammer-systolen angesehen.

Die glykosidbedingten Veränderungen der Aktionspotentiale prädisponieren deshalb die Purkinjefasern zu erhöhter Automtizität und ventrikulärer Schrittmacheraktivität (16, 26, 48, 54, 85, 124, 173, 211, 215, 228, 246).

Tabelle 1:

Toxische Herzrhythmusstörungen und Serumglykosidkonzentrationen bei 246 elektrokardiographisch gesicherten Glykosidintoxikationen mit Digoxin und Digoxinderivaten.

Art der Rhythmusstörung	Anzahl	%	Serumglykosidkonz.
			ng/ml ($\bar{x} \pm SD$)
AV-Block I	61	25	3.2 ± 0.86
Ventrikuläre Extrasystolen	44	18	2.9 ± 0.59
Bradykardes Vorhofflimmern	28	11	3.5 ± 1.58
Ventrikulärer Bigeminus	25	10	3.4 ± 1.40
AV-Block II	17	7	3.9 ± 1.68
Typ I (Wenckebach)	12		4.1 ± 1.91
Typ II (Mobitz)	5		3.4 ± 1.15
Vorhofftachykardie mit Block	17	7	4.4 ± 2.04
AV-Block III	9	4	5.4 ± 2.15
Sinusbradykardie	8	3	2.8 ± 0.50
Knotenrhythmus	7	3	3.7 ± 1.21
Supraventrikuläre Extrasystolen	7	3	3.1 ± 0.87
Kammerflimmern	7	3	6.3 ± 3.35
SA-Block	6	2	4.3 ± 1.33
Kammertachykardie	4	2	4.0 ± 1.06
AV-Dissoziation	3	1	4.2 ± 1.29
Linksschenkelblock	2	1	2.8 ± 0.21
Supraventrikuläre Tachykardie	1	0.5	3.3

Nach: Larbig et al. (157)

Tabelle 2:

Elektrophysiologische Wirkungen von Herzglykosiden an unterschiedlichen Gewebearten des Herzens

Elektrophysiolog. Eigenschaft	Wirkung
Schrittmacher-Automatie	
SA-Knoten	↓ (↑ nach Atropin oder tox. Konz.)
Purkinjefaser	↑
Erregbarkeit	
Vorhof	↔ X
Ventrikel	variabel X
Purkinjefaser	↑ X
Reizleitungsgeschwindigkeit	
Vorhof	↑ (gering) X
Ventrikel	↑ (gering) X
AV-Knoten	↓
Purkinjefaser	↓
Effektive Refraktärzeit	
Vorhof	↓ (↑ nach Atropin)
Ventrikel	↓
AV-Knoten	↑
Purkinjefaser	↑ X

↑ = zunehmend; ↓ = abnehmend; ↔ = keine signifikante Änderung

X = abnehmend bei hoch-toxischen Glykosidkonzentrationen

Nach: Moe, G. K. und Farah, A. E.: Digitalis and allied glycosides (180)

Aus: Kloner, R. A.: The Guide To Cardiology (143)

1.5. Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Im Laufe der Jahre untersuchten unterschiedliche Forschungsgruppen mit verschiedenen elektrophysiologischen oder biochemischen, methodischen Ansätzen die Wirkungen von Herzglykosiden auf das periphere Reizleitungssystem.

Die Ergebnisse dieser Studien sind jedoch uneinheitlich:

So berichteten beispielsweise Vassalle und Kollegen (246, 247, 248), Kübler und von Smekal (146) und Nowak und Haustein (184) von einer erhöhten Glykosidempfindlichkeit des Reizleitungssystems im Vergleich zum Arbeitsmyokard, die jedoch von anderen Forschungsgruppen (187, 205) nicht bestätigt werden konnte.

Erst kürzlich wurde an den Spezies Ratte und Meerschweinchen die Existenz zweier, spezifischer Glykosidrezeptoren nachgewiesen (2, 35, 75). Sweadner (235) demonstrierte an Hirnzellmembranen der Ratte, daß diese verschiedenen Rezeptorgattungen auch auf zwei unterschiedlichen Zelltypen lokalisiert sind. Falls sich glykosidspezifische Unterschiede des Reizleitungssystems bestätigen lassen und falls nachgewiesen werden könnte, daß diese Unterschiede auf der Existenz von unterschiedlichen Rezeptoren beruhen - dann sollte es möglich sein, ein cardial wirksames Glykosid zu synthetisieren, das rezeptorselektiv und damit gewebe selektiv bindet.

Es bestünde dann die Möglichkeit, die therapeutische Glykosid-Wirkung auf das Arbeitsmyokard des Herzens von den toxischen Effekten auf das Reizleitungssystem, die die Ursache der häufigsten und bedeutsamsten Nebenwirkungen von Herzglykosiden im klinischen Gebrauch sind, zu trennen.

Da in den bisherigen Studien, die diese Problematik behandelten, nur verschiedene Teilaspekte der Glykosidwirkung auf unterschiedliche Gewebe des Herzens verglichen wurden, will die vorliegende Arbeit durch Kombination mehrerer methodischer Ansätze unter Verwendung von Schafherzen versuchen, gleichzeitig die Glykosid-Bindung und Hemmung der $(\text{Na}^+ - \text{K}^+) - \text{ATPase}$ bzw. Glykosid-Bindung und inotrope Wirkung oder Hemmung des aktiven Na^+ / K^+ -Transportes zu bestimmen und in verschiedenen Gewebearten des Herzens zu vergleichen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen deshalb folgende Fragen untersucht und diskutiert werden:

- 1.) Läßt sich am Schafherzen ein glykosidspezifischer Rezeptor charakterisieren und - wenn ja - wieviele Rezeptorgattungen lassen sich nachweisen?
- 2.) Kann der postulierte Wirkungsmechanismus von Glykosid-Bindung und pharmakologischen Effekten am Schafherzen bestätigt werden und welcher Zusammenhang besteht zwischen diesen Parametern?
- 3.) Lassen sich qualitative oder quantitative Unterschiede der Glykosid-Bindung und -Wirkung zwischen Reizleitungssystem und Arbeitsmyokard des Schafherzens nachweisen?

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. Materialien

g-Strophanthin wurde von C. F. Boehringer, Mannheim, bezogen, (^3H)-g-Strophanthin (spezifische Aktivität 14 - 20 Ci/mmol, 1 Ci = 3.7×10^{10} Bq) von New England Nuclear, 6072 Dreieich, und $^{86}\text{RbCl}$ (spezifische Aktivität 0,9 - 4,2 mCi/mg) von Amersham Buchler, Braunschweig.

Zur Auflösung der Organpräparate fand Soluene 350 (Fa. Packard, Zürich) und als Szintillationsflüssigkeit Quickszint 501 oder Unisolve 1 (Koch-Light Lab., W. Zinsser, Frankfurt a. M.) Verwendung. Alle anderen Chemikalien und Testenzyme waren von analytischer Reinheit und stammten entweder von C. F. Boehringer, Mannheim, oder E. Merck, Darmstadt.

In allen Versuchen wurde ausschließlich Aqua bidestillata verwendet.

Als Versuchstiere dienten Schafe (beiderlei Geschlechtes, Mindestalter 1 Jahr, ansonsten keine Alterspräferenz), denen an den örtlichen Schlachthöfen unmittelbar nach Tötung das noch schlagende Herz entnommen wurde.

2.2. Methoden

2.2.1. Statistische Analyse

Die Ergebnisse wurden entweder als Mittelwert, $\bar{x}$, angegeben oder - in der überwiegenden Zahl der Versuche, bei denen $n \geq 3$ - als Mittelwert, $\bar{x} \pm \text{sem}$.

Die Mittelwerte wurden mit dem Test nach Nalimov auf Ausreisserfestigkeit untersucht.

Ein Vergleich der Ergebnisse und die Überprüfung auf statistische Signifikanz erfolgte mit dem student's t-test für unverbundene Stichproben (137).

2.2.2. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Membranpräparationen wurde nach der Methode von Lowry et al. (167) in Doppelbestimmungen ermittelt. Mit Folinreagenz und Rinderserumalbumin als Standard wurde dabei die Extinktion bei 578 nm Wellenlänge gemessen.

2.2.3. Messung der Aktivität der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase in Membranpräparationen

Adenosintriphosphatasen (ATPasen) spalten Adenosintriphosphat (ATP) hydrolytisch in Adenosindiphosphat (ADP) und anorganisches Phosphat (P_i).

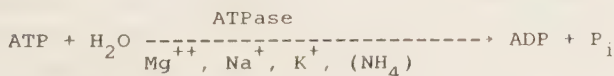
In zwei Folgereaktionen kann die Zunahme von ADP mit der Spaltung von Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid- H_2 ($\text{NADH} + \text{H}^+$) gekoppelt werden, die wiederum photometrisch meßbar ist.

Hierzu wird erstens das entstandene ADP mittels der Pyruvatkinase (PK) unter Zugabe von Phosphoenolpyruvat (PEP) phosphoryliert und zweitens das dabei entstandene Pyruvat bei Zugabe von Laktatdehydrogenase (LDH) unter Umwandlung von $\text{NADH} + \text{H}^+$ in NAD und Laktat reduziert.

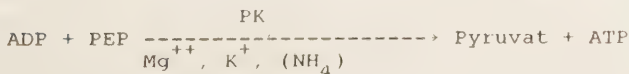
Da sich sowohl Phosphorylierung als auch Reduktion im Verhältnis 1 : 1 vollziehen, kann auf Grund der stöchiometrischen Beziehung der Hydrolyse des ATP und der Oxydation des NADH die ATPase-Aktivität direkt aus der zeitlichen Abnahme der NADH-Konzentration photometrisch bestimmt werden.

Zur Aktivierung der ATPase werden Magnesium-, Natrium- und Kalium- bzw. Ammoniumionen in den angegebenen Konzentrationen der Lösung beigelegt.

1)



2)



Die Enzymaktivität ergibt sich als:

$$\text{Enzymaktivität (U)} = \frac{\Delta E \times x \times V}{e \times x \times v}$$

ΔE = Extinktion (min^{-1}) V = Gesamtvolumen (ml)

e = Extinktionskoeffizient 6,18 ($\text{cm}^2/\mu\text{mol}$)

v = Enzymmenge (ml)

Unter 1 Enzymeinheit (U) versteht man den Umsatz von 1 μmol ATP pro Minute bei 37 °C.

Die Aktivität wird in der Regel im weiteren Verlauf mit (U/mg Protein) angegeben.

Die Messung der Aktivität erfolgte mit einem Eppendorfer-Photometer 1101 M bei einer Wellenlänge von 334 nm kontinuierlich bei 37 °C, die Aufzeichnung mit dem Eppendorfer-Kompensationschreiber 6511. Der Innendurchmesser der Küvette betrug 1 cm.

Die ATPase Testlösung - 1.5 ml/Küvette - setzte sich zusammen aus:

66.6 mM	Imidazol/HCL, pH 7.25
100 mM	NaCl
66.6 mM	NH_4Cl
3.3 mM	MgCl_2
3.3 mM	ATP
1.6 mM	PEP
0.3 mM	NADH
6 U	Pyruvatkinase
6 U	Laktatdehydrogenase

Der Testlösung wurden 0.1 - 0.3 ml Enzympräparation zugegeben, sodaß die Extinktion ca. 0.2/min betrug.

Dieses Verfahren eignet sich zur Messung aller, durch Magnesium aktivierbaren ATPasen. Da uns im weiteren Verlauf primär die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ ATPase interessiert, diese aber konzentrationsabhängig durch g-Strophanthin hemmbar ist, wurde in 2 parallelen Ansätzen mit aliquoten Enzymmengen der Aktivitätsverlauf ohne und in der Anwesenheit von $1 \times 10^{-3} \text{M}$ g-Strophanthin bestimmt. Die spezifische $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase ergibt sich aus der Differenz von gesamter Aktivität und der Aktivität, die nicht durch Strophanthin hemmbar ist (= unspezifische ATPase-Aktivität).

Der Reinheitsgrad der Präparation ergibt sich als prozentualer Anteil der spezifischen ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität an der Gesamtaktivität (siehe auch Schoner et al., 217).

2.3. Untersuchungen an Zellmembranhomogenaten

Alle nachfolgenden Teilschritte erfolgten in vorgekühlten Gefäßen und mit vorgekühlten Lösungen, in mit Eis gefüllten Behältnissen oder im Kühlraum.

Alle Zentrifugationen wurden, sofern nicht gesondert angegeben, in einer Ultrazentrifuge (Beckmann, L5-50) mit einem Ti/35-Rotor bei +4 °C durchgeführt.

2.3.1. Präparation und Isolierung von Herzmuskelzellmembranen

An örtlichen Schlachthöfen wurden die Herzen unmittelbar nach Tötung der Schafe entnommen und für den weiteren Transport in eiskalte Saccharose-EDTA-Pufferlösung (1 mM EDTA, 0.25 M Saccharose, pH 7.25) gelegt.

Der linke Ventrikel wurde ohne den Anteil des septum interventriculare entnommen, wobei die Schnittführung unterhalb der Klappenansätze verlief, und wurde von Fettgewebe, eventuellen Resten von Sehnenfäden, Purkinjefasern, Epi- und Endokard befreit, in Stücke von jeweils circa 60 g Feuchtgewicht zerteilt und bis zur Weiterverarbeitung bei -40 °C tiefgefroren.

Nach dem Auftauen bei Zimmertemperatur wurde ein Ventrikelteil von 60 g abgewogen, zuerst mit einer Schere in 150 ml Saccharose-EDTA-Puffer zerkleinert und dann mit einem Mixer (Starmix, Braun MX 32) erst 30 sec lang auf höchster Geschwindigkeitsstufe, nach Zugabe weiterer 200 ml Pufferlösung nochmals für 30 sec homogenisiert.

Der von der Konsistenz her leicht flüssige Brei wurde in der Ultrazentrifuge bei 15 000 g 15 min lang zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Niederschlag in 200 ml Saccharose-EDTA-Puffer gelöst und mit dem Mixer (60 sec bei höchster Geschwindigkeit) weiter zerkleinert.

Das Homogenat wurde mit der Pufferlösung auf 300 ml ergänzt und 30 ml 5 %-Desoxycholat-Lösung tropfenweise unter dauerndem Rühren mit einem Rührkern innerhalb 1 min zugegeben.

Nach exakt 20 min wurde das Homogenat zentrifugiert (100 000 g, 30 min Dauer), dieses Mal der Niederschlag verworfen und der Überstand mit EDTA-Puffer (1 mM EDTA, pH 7.25) auf 400 ml aufgefüllt.

Nach nochmaligem Zentrifugieren (100 000 g, 90 min Dauer) wurde der Niederschlag mit 60 ml EDTA-Puffer versetzt und mit einem Glas-Teflon-Potter (Braun, Melsungen) homogenisiert. Das Homogenat wurde über Nacht bei -40°C eingefroren und erwies sich in diesem Zustand als über Wochen hinaus stabil.

Zur weiteren Verwendung wurde das Homogenat bei Zimmertemperatur langsam aufgetaut, mit dem Glas-Teflon-Potter homogenisiert, mit EDTA-Puffer auf 240 ml aufgefüllt und bei 75 000 g 30 min lang zentrifugiert.

Der Niederschlag wurde mit EDTA-Puffer auf 90 ml ergänzt und mit dem Potter homogenisiert.

1 ml MgCl_2 -Lösung (0.1 M) und 18 ml frisch bereitete NaJ-Lösung (6 M) wurden tropfenweise innerhalb 1 min unter ständigem Rühren (magnetischer Rührkern) zugegeben.

Nach exakt 5 min wurde das Homogenat auf 240 ml mit EDTA-Puffer aufgefüllt und bei 75 000 g 30 min lang zentrifugiert.

In 4 weiteren Waschgängen wurde jeweils dem Niederschlag 60 ml EDTA-Pufferlösung zugegeben, mit dem Glas-Teflon-Potter homogenisiert und bei 75 000 g 30 min lang zentrifugiert, um die Zellmembranen von der Natriumjodidlösung möglichst wieder zu befreien. Nach dem letzten Zentrifugieren wurde das Sediment mit 60 ml EDTA-Puffer ergänzt, nochmals mit dem Potter homogenisiert und bis zum Verbrauch im Eisschrank bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Nach dieser Präparation und Aufbereitung wurde die Aktivität der in den Zellmembranen enthaltenen ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPasen (siehe 2.2.3.) und der Proteingehalt des Homogenates (siehe 2.2.2.) bestimmt.

2.3.2. Präparation von Gewebehomogenaten aus unterschiedlichen Anteilen des Schafherzens

Die Gewebe (0.3 - 1.5 g Feuchtgewicht) entstammten dem linken oder dem rechten Ventrikel, dem Moderatorband oder den Purkinjefasern.

Der Transport des Herzens und die Präparation des linken Ventrikels erfolgte wie in 2.3.1. beschrieben. Analog dazu wurde der rechte Ventrikel präpariert und aus beiden Ventrikeln Gewebestücke von maximal 1.5 g Feuchtgewicht seziiert.

Das Moderatorband (trabecula septomarginalis, vgl. photographische Abbildung 4 und 2.4.1.), das im rechten Ventrikel vom proximalen Drittel des septum interventriculare zur gegenüberliegenden Ventrikelwand verläuft, wurde in Höhe der Insertionsstellen durchtrennt, von Endokard befreit und - wie unten beschrieben - weiter verarbeitet.

Der Teil der Purkinjefasern, der als sogenannte "falsche Sehnenfäden" (vgl. photographische Abbildung 3 und 2.4.1.) vom proximalen Drittel des septum interventriculare entweder zum Papillarmuskel oder zur gegenüberliegenden Ventrikelwand verläuft, wurde den Ventrikeln entnommen.

Dabei waren nur selten im rechten Ventrikel frei verlaufende Purkinjefasern zu finden, die dann in der Regel nur kurz und von geringem Umfang waren, sodaß der überwiegend verwendete Teil der Purkinjefasern aus dem linken Ventrikel stammte.

Die erforderliche Mindestmenge lag bei 0.3 g Feuchtgewicht, doch wurde in der Regel aus einer Menge von Purkinjefasern, die ca. 0.7 g Feuchtgewicht entsprach, ein Zellhomogenat hergestellt.

Das jeweilige Gewebe wurde zwischen Saugpapier gelegt, um es von anhaftender Lösung zu befreien, zuerst mit einer Schere zerkleinert und dann mit einem vorgekühlten Glas-Homogenisator (Braun, Melsungen) in ca. 30 ml kaltem Saccharose-EDTA-Puffer so lange zerrieben, bis ein nicht weiter verarbeitbarer Rest des Gewebes zurückblieb. Dieser Rest wurde gewogen und vom Ausgangsgewicht subtrahiert, um das effektiv im Homogenat befindliche Gewebegewicht zu erhalten (g Feuchtgewicht).

Das Homogenat wurde in der Ultrazentrifuge mit dem Rotor Ti/60 30 min lang mit 100 000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Niederschlag in 5 - 30 ml kaltem EDTA-Puffer (1 mM EDTA, pH 7.25) mit dem Glas-Teflon-Potter homogenisiert. Die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität und der Proteingehalt wurden bestimmt und die Suspension bis zur baldigen Verwendung bei +4 °C gelagert.

- 2.3.3. (^3H) -g-Strophanthin-Bindung an Zellmembranhomogenate
- Versuchsaufbau - Prinzip der raschen Filtration
 - Bestimmung der proteingebundenen Radioaktivität

Zellmembranhomogenate (0.1 - 0.2 ml, entweder isolierte Zellmembranen oder Gewebehomogenate) wurden unter den unten aufgeführten Bedingungen mit ca. 1×10^{-9} M (^3H) -g-Strophanthin in Propylen-Zentrifugen-Röhrchen (passend für den Beckmann-Rotor Ti/50, 10 ml Kapazität, Fa. Christ, Osterode, Harz) inkubiert.

Das Gesamtreaktionsvolumen pro Ansatz betrug 2 ml, jeder einzelne Wert ergab sich aus Zweifachbestimmungen und jeder Versuch wurde mindestens zweimal durchgeführt.

Da die Bindungsstelle (= Herzglykosidrezeptor) für (^3H) -g-Strophanthin membrangebunden ist, läßt sich durch Filtration das nicht gebundene, frei im Reaktionsmedium sich befindende (^3H) -g-Strophanthin von dem proteingebundenen (^3H) -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplex trennen.

Deshalb wurde nach Beendigung der Inkubationszeit, die aus den zeitabhängigen Bindungsversuchen ermittelt worden war, die (^3H) -g-Strophanthin-Rezeptor-Reaktion durch ca. 10 ml eiskaltes Aqua bidest. gestoppt und das Reaktionsmedium rasch in das Filtriergerät - einer Nutsche mit angeschlossener Wasserpumpe - entleert.

Der (^3H) -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplex blieb dabei an der Oberfläche des Mikro-Glasfaserfilters (Whatman GF/C, 25 mm Durchmesser) haften. Das Inkubationsröhrchen und der Vakuumfilter wurden durch zweimaliges Nachspülen und Abfiltern mit Aqua bidest. von eventuell noch anhaftendem Reaktionsmedium befreit.

Die radioaktiven Glasfaserfilter eines Versuches wurden auf einer Glasplatte in einem Wärmeschrank bei 90 °C 20 min lang getrocknet, einzeln in Szintillationsröhrchen gegeben und mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Quickszint 501, W. Zinsser, Frankfurt a. M.) überdeckt.

Die Radioaktivität der (^3H)-g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexe auf den Glasfaserfiltern wurde 4 min lang im Tritiumkanal (Packard Tricarb 2660, Packard Instr. Co. Inc., Warrenville, RD, oder BF Betaszint 5000, Fa. Berthold) in der Einheit "counts per minute" (= cpm) gegen einen externen Standard gemessen.

2.3.4. Bestimmung von spezifischer und unspezifischer Bindung

Aus den konzentrationsabhängigen ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivitäts-Kurven ging hervor (Abbildung 12), daß die ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase bei 2×10^{-8} M g-Strophanthin bereits zu 90 % und bei 1×10^{-4} M sicher zu 100 % gehemmt wurde.

Jede Bindung von (^3H)-g-Strophanthin bei Konzentrationen $\geq 1 \times 10^{-4}$ M erfolgte demnach entweder an ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPasen, die nicht durch Glykoside hemmbar waren, an anderen Membranproteinen oder uncharakteristisch an den Glasfaserfilter.

Eine Bindung unter solchen Bedingungen wurde als "unspezifisch" definiert und bei jedem Versuch in Dreifachbestimmung ermittelt.

Hierbei wurde neben den jeweiligen Ansatzlösungen noch 1×10^{-4} M unmarkiertes g-Strophanthin in die Reaktionsröhrchen einpipettiert, die dann dementsprechend weniger Aqua bidest. enthielten. Der Versuchsverlauf blieb unverändert.

Analog ist die spezifische Bindung definiert als der Anteil an der Gesamtbindung, der durch g-Strophanthin hemmbar ist. Sie resultiert folglich aus der Subtraktion der unspezifisch gebundenen Radioaktivität von der gebundenen Gesamtaktivität.

2.3.5. Bestimmung der maximalen (^3H)-g-Strophanthin-Radioaktivität pro Reaktionsansatz

Bei jedem Versuch wurde in Dreifachbestimmungen ein Aliquot der pro Reaktionsröhrchen eingesetzten Menge an (^3H)-g-Strophanthin ($10\ \mu\text{l} = \text{ca. } 1 \times 10^{-9}\ \text{M}$) auf einen Glasfaserfilter pipettiert, 20 min bei $90\ ^\circ\text{C}$ im Wärmeschrank getrocknet und nach Zugabe von 10 ml Szintillationsflüssigkeit die Radioaktivität im Tritiumkanal gemessen.

2.3.6. Zeitabhängige Assoziation von (^3H)-g-Strophanthin an den Rezeptor

Das Inkubationsmedium aus 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , 50 mM Imidazol/ HCl , pH 7.25 und $1 \times 10^{-9}\ \text{M}$ (^3H)-g-Strophanthin wurde in die Reaktionsröhrchen pipettiert und in einem Wasserbad (Braun, Melsungen, Typ 851502) auf die angegebene Temperatur erwärmt.

Der Versuch wurde durch Zugabe von 0.1 ml Zellmembranhomogenat gestartet, nach Ablauf der angegebenen Inkubationszeit die Reaktion durch rasche Filtration gestoppt und die Radioaktivität bestimmt (siehe 2.3.3.).

Versuchsansatz:

0.06 ml	MgCl_2	0.1 M	
0.06 ml	Imidazol/ PO_4	0.1 M	pH 7.25
0.10 ml	Imidazol/ HCl	1.0 M	pH 7.25
0.01 ml	(^3H)-g-Strophanthin		
0.10 ml	Zellmembranhomogenat		
<u>1.67 ml</u>	<u>Aqua bidest.</u>		
2.0 ml	Gesamtvolumen/Ansatz		

2.3.7. g-Strophanthin-konzentrationsabhängige (^3H)-g-Strophanthin-Bindung

Das Inkubationsmedium aus 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , 50 mM Imidazol/ HCl , pH 7.25 und $\text{ca. } 1 \times 10^{-9}\ \text{M}$ (^3H)-g-Strophanthin

wurde in die Polypropylen-Zentrifugen-Röhrchen pipettiert und unmarkiertes g-Strophanthin in ansteigenden Konzentrationen zugegeben. Der Inhalt wurde mit Aqua bidest. auf 2 ml ergänzt, der Ansatz im Wasserbad auf die angegebene Temperatur erwärmt und durch Zugabe von 0.1 ml Zellmembranhomogenat der Versuch gestartet.

Versuchsansatz:

0.06 ml	MgCl ₂	0.1 M	
0.06 ml	Imidazol/PO ₄	0.1 M	pH 7.25
0.10 ml	Imidazol/HCl	1.0 M	pH 7.25
0.01 ml	(³ H)-g-Strophanthin		
0.20 ml	g-Strophanthin	1 x 10 ⁻⁸ M - 2 x 10 ⁻⁷ M	
0.10 ml	Zellmembranhomogenat		
<u>1.47 ml</u>	<u>Aqua bidest.</u>		
2.0 ml	Gesamtvolumen/Ansatz		

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Versuch durch rasches Abfiltrieren beendet und die Radioaktivität bestimmt (siehe 2.3.3.). Die Inkubationszeiten bei den verschiedenen Temperaturen waren 5 h für 37 °C, 12 h für 30 °C, 24 h für 20 °C und 48 h für 10 °C, nachdem Versuche zur zeitabhängigen g-Strophanthin-Bindung gezeigt hatten, daß Äquilibriumbedingungen - also das Erreichen des Bindungsmaximums - innerhalb dieser Zeiten erreicht wurden.

Zusätzlich zu den genannten Werten wurden die unspezifische (³H)-g-Strophanthin-Bindung, die in der Ansatzlösung befindliche (³H)-g-Strophanthin-Radioaktivität und die maximale (³H)-g-Strophanthin-Bindung - d. h. die Bindung ohne unmarkiertes g-Strophanthin - bestimmt.

2.3.8. Zeitabhängige Dissoziation von (³H)-g-Strophanthin von dem Rezeptor

Die Dissoziationsrate läßt sich selektiv ermitteln, indem man (³H)-g-Strophanthin maximal binden läßt (= Äquilibrium), sodann die (³H)-g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexe isoliert und erneut in Lösung mit einer hohen Konzentration an unmarkiertem

g-Strophanthin bringt. Jedes zeitabhängig dissoziierende (^3H)-g-Strophanthin-Molekül wird nun hochwahrscheinlich von unmarkiertem g-Strophanthin ersetzt, d. h. der Anteil der (^3H)-g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexe an der Gesamtheit der Komplexe wird sich abhängig von der Zeit zunehmend verringern. Die Rate dieser Abnahme - also die Rate der Dissoziation von (^3H)-g-Strophanthin - läßt sich somit aus der Abnahme der Radioaktivität pro Zeiteinheit bestimmen.

2.3.8.1. Herstellung und Isolierung des (^3H)-g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes

Das Inkubationsmedium aus 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , 50 mM Imidazol/HCl, pH 7.25 und ca. 1×10^{-9} M (^3H)-g-Strophanthin wurde in einem einzigen Erlenmeyerkolben im Schüttelbad auf die angegebene Temperatur erwärmt und der Versuch durch Zugabe einer größeren Menge Zellmembranhomogenates (in der Regel 3.5 ml) gestartet.

Versuchsansatz:

0.18 ml	MgCl_2	0.1 M	
0.18 ml	Imidazol/ PO_4	0.1 M	pH 7.25
0.30 ml	Imidazol/HCl	1.0 M	pH 7.25
0.10 ml	(^3H)-g-Strophanthin		
3.50 ml	Zellmembranhomogenat		
1.74 ml	Aqua bidest.		
6.0 ml	Gesamtvolumen/Ansatz		

Nach Ablauf der Inkubationszeit, die - wie bei den Versuchen zur konzentrationsabhängigen Bindung - den Kurvenverläufen der zeitabhängigen Bindung entnommen wurde, wurde der (^3H)-g-Strophanthin-Rezeptor-Komplex durch Zentrifugation (Beckmann 15-50, Rotor Ti/60) mit 100 000 g 30 min lang bei +4 °C von freiem (^3H)-g-Strophanthin getrennt.

Der Überstand - und mit ihm das freie (^3H)-g-Strophanthin - wurde verworfen, das die (^3H)-g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexe enthaltende Sediment mit einem Spatel entnommen und in 6 ml kaltem Aqua bidest. in einem Glas-Teflon-Potter (Braun, Messungen) homogenisiert.

2.3.8.2. Messung der Dissoziation der (^3H)-g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexe

0.3 ml Inkubationsmedium wurde mit einer Endkonzentration von 1×10^{-4} M unmarkiertem g-Strophanthin und 1.3 ml Aqua bidest. in Zentrifugenröhrchen pipettiert und auf die angegebene Temperatur erwärmt. 0.2 ml Homogenat mit (^3H)-g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexen startete den Versuch.

Inkubationsmedium:

1.8 ml	MgCl_2	0.1 M	
1.8 ml	Imidazol/ PO_4	0.1 M	pH 7.25
3.0 ml	Imidazol/HCl	1.0 M	pH 7.25
<u>2.4 ml</u>	<u>Aqua bidest.</u>		
9.0 ml	Gesamtlösung		

Versuchsansatz:

0.3 ml	Inkubationsmedium
0.2 ml	g-Strophanthin 1×10^{-3} M
1.3 ml	Aqua bidest.
<u>0.2 ml</u>	<u>Substrat-Rezeptor-Homogenat</u>
2.0 ml	Gesamtvolumen/Ansatz

Zu den angegebenen Zeiten wurde der Versuch durch Auffüllen mit eiskaltem Aqua bidest. beendet und der dissoziierte - und damit freie - (^3H)-g-Strophanthin-Anteil durch rasches Abfiltrieren von dem noch proteingebundenen (^3H)-g-Strophanthin-Anteil getrennt und die Radioaktivität bestimmt.

2.3.9. Mg^{2+} , ATP und Na^+ -unterstützte (^3H)-g-Strophanthin-Bindung

Um den Einfluß der Komponenten des Inkubationsmediums auf die Affinität von (^3H)-g-Strophanthin zu dem Glykosidrezeptor bewerten zu können, wurde statt des in den übrigen Versuchen verwendeten Inkubationsmediums aus 3mM MgCl_2 , 3mM Imidazol/ PO_4 , 50mM Imidazol/HCl, pH 7.25 eine Ansatzlösung hergestellt aus 150mM NaCl, 3mM ATP, 3mM MgCl_2 und 50mM Imidazol/HCl, pH 7.25. Die jeweilige Versuchsdurchführung wurde unverändert belassen.

Beispiel (Ansatz zur zeitabhängigen Bindung):

0.06 ml	MgCl ₂	0.1 M	
0.06 ml	ATP	0.1 M	
0.10 ml	Imidazol/HCl	1.0 M	pH 7.25
0.30 ml	NaCl		
0.01 ml	(³ H)-g-Strophanthin		
0.10 ml	Zellmembranhomogenat		
1.37 ml	Aqua bidest.		
2.0 ml	Gesamtvolumen/Ansatz		

2.4. Untersuchungen an elektrisch stimulierten, schlafenden Purkinjefasern und an Moderatorbandstreifen des Säugetiers.

2.4.1. Präparation der Gewebe

Die Herzen erhielt man von den örtlichen Schlachthöfen. Unmittelbar nach der Tötung der Schafe (männlich oder weiblich; ohne Alterspräferenz) wurden die noch schlagenden Herzen entnommen. Der Transport wie auch die nachfolgenden Präparationen erfolgten in gekühlter Krebs-Henseleit-Lösung (= modifizierte Tyrode-Lösung, pH 7.4), die kontinuierlich mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) perfundiert wurde.

Krebs-Henseleit-Lösung:

NaCl	118.0 mmol/l
KCl	4.7 mmol/l
MgSO ₄	1.2 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1.2 mmol/l
NaHCO ₃	25.0 mmol/l
CaCl ₂	2.5 mmol/l
Glucose	10.0 mmol/l

Die für die Kontraktionsversuche verwendeten Gewebe waren Purkinjefasern - als Teil des Reizleitungssystems - und - repräsentativ für das Arbeitsmyokard - das Moderatorband. Die Purkinjefasern (vgl. photographische Abbildung 3) werden im proximalen Drittel des septum interventriculare sichtbar

und sind als silbrig-gläserne, faserige, subendocardial gelegene Strukturen dort leicht zu identifizieren. Sie verzweigen sich fächerförmig und verlaufen sowohl zu den seitlichen Ventrikelwänden als auch in Richtung auf die Herzspitze zu. Liegt der Großteil der Fasern auch subendocardial, so verläuft doch ein kleiner Teil frei vom septum interventriculare direkt zum Papillarmuskel oder zur gegenüberliegenden Ventrikelwand. Auf Grund ihres glänzenden, milchig-weißlichen Aussehens, ihres Durchmessers von ca. 0.1 - 0.7 mm und damit ihrer Ähnlichkeit zu den Sehnenfäden, die die Herzklappenränder mit den Papillarmuskeln verbinden, werden diese frei verlaufenden Purkinjefasern auch als "falsche/abnorme Sehnenfäden" bezeichnet (Tawara, 241). Die frei verlaufenden Purkinjefasern, die auf Grund ihrer Größe für Kontraktionsversuche verwendet werden konnten, wurden - ohne sie zu dehnen - zumeist dem linken Ventrikel entnommen und wurden bei einem Durchmesser von 0.3 - 0.7 mm auf eine Länge von maximal ca. 8 mm gekürzt (Feuchtgewicht 3.5 - 8 mg). Wie bereits erwähnt (2.3.2) waren frei verlaufende Purkinjefasern im rechten Ventrikel nur selten zu finden und waren dann meist zu kurz und zu dünn.

Es bleibt anzumerken, daß manchmal Purkinjefasern auftraten, die einen wesentlich größeren Umfang und einen zart-rosa, muskelähnlichen Farbton besaßen. Da dies auf einen erhöhten Anteil an reinen Myokardzellen hinwies, wurden solche Fasern nicht verwendet. Das Moderatorband (vgl. photographische Abbildung 4), das im rechten Ventrikel vom proximalen Teil des septum interventriculare zur gegenüberliegenden Ventrikelwand ebenfalls frei verläuft, nimmt innerhalb des Myokards eine Sonderstellung ein, da nur dort die Muskelfasern parallel verlaufen (vgl. auch 2.3.2.). An den Insertionsstellen wurde es ohne Überdehnen durchtrennt und auf eine Länge von maximal 8 mm gekürzt. Häufig lag der Durchmesser zwischen 0.6 - 0.8 mm und das Gewebestück konnte so belassen werden. Überschritt jedoch der Durchmesser 0.8 mm (maximaler Durchmesser ca. 3 mm), so wurde durch 1-2 Schnittführungen in Faserrichtung ein Gewebestreifen mit einem Durchmesser $\leq$ 0.8 mm präpariert (Feuchtgewicht 5 - 13 mg).



Abbildung 3: Das Schafherz - Blick auf den linken Ventrikel

Die Purkinjefasern (+) sind im eröffneten, linken Ventrikel im proximalen Drittel des septum interventriculare als milchig-glasiges, subendocardial verlaufendes Bündel zu erkennen, das sich im weiteren Verlauf verzweigt und zum Teil oberflächlich als sog. "falsche Sehnenfäden" frei zu den gegenüberliegenden Ventrikelwänden und den Papillarmuskeln zieht. Davon abzugrenzen sind die Sehnenfäden (▷), die von den Papillarmuskeln direkt zu den Klappenrändern (hier der Mitralklappe) verlaufen.



Abbildung 4: Das Schafherz - Blick auf den rechten Ventrikel
Das Moderatorband (+) ist im eröffneten rechten Ventrikel als Myokardstrang zu erkennen, der vom proximalen Drittel des septum interventriculare zum Papillarmuskel bzw. der gegenüberliegenden Ventrikelwand frei verläuft.

2.4.2 Versuchsanordnung zur Messung von Kontraktionskraft bei elektrischer Stimulation

Das Präparat befand sich in einer Glaskammer mit 75 ml Krebs-Henseleit-Lösung (pH 7.4), die kontinuierlich mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast und durch ein umgebendes Wasserbad (Fa. Haake, Typ F 4391) auf 35 °C ± 0.5 °C konstant erwärmt wurde. Durch ein Ende des Präparates wurde ein an der Apparatur fixierbarer Haken gezogen, durch das andere Ende die abgewinkelte Nadel einer atraumatischen Naht (Prolene® 6 - 0.07 metric, Fa. Ethicon). Der freie Faden wurde mit einem weiteren Haken fest verknötet und dieser in einen induktiven Kraftaufnehmer (BB Electronic, Transducer F 10 DC) eingehängt, über dessen Höhenverstellung mittels einer Mikrometerschraube die Vorspannung des Präparates reguliert werden konnte.

Die durch die elektrische Stimulation ausgelöste Kontraktion des Präparates wurde über den Kraftaufnehmer und einen nachgeschalteten Vorverstärker (TF 19, Hellige) von einem Schreiber (Gould 2400, Gould Inc., Cleveland, Ohio, U.S.A., bzw. Hellige Recomed, Hellige GmbH, Freiburg i. Br.) aufgezeichnet (Für technische Details vgl. Meinertz et al., 177).

Die Aufzeichnung erfolgte bei allen Versuchen kontinuierlich von Anfang bis Ende eines Versuches.

Die elektrische Stimulation erfolgte als Rechteckimpuls durch zwei Platin-Elektroden entweder von einem Grass SD9 oder Grass S88-Stimulator (Fa. Grass Medical Instruments, Quincy, Mass., U.S.A.) mit einer Impulsfrequenz von 1 Hz, einer Impulsdauer von 5 msec und einer Spannung zwischen 5mV und 16mV, die jeweils 10 % - 20 % über dem Schwellenwert lag.

Nach Einspannen des Präparates wurde ihm eine Äquilibrierungszeit von mindestens 60 min eingeräumt. Während dieser Zeit (nach ca. 30 min Stimulation) wurde diejenige Vorspannung, bei der unter gleichbleibenden Bedingungen die Kontraktionskraft ihr Maximum erreichte (optimales Preload), mittels vorsichtiger Erhöhung der Aufhängungskraft ermittelt.

Wiederholt wurde dabei der Schwellenwert der Impulsspannung überprüft, um sie auf ca. 10 % - 20 % über diesem Wert zu halten. Nach ca. 45 min Stimulation wurde das Inkubationsmedium

gewechselt. Jedes Präparat wurde nur für einen einzigen Versuch mit einer bestimmten g-Strophanthin-Konzentration verwendet.

2.4.3. Bestimmung des Feuchtgewichtes

Am Ende eines Versuches wurde das Präparat von den Haken genommen, 30 sec. lang mit eiskaltem Aqua bidest. abgespült, 3 Mal zwischen Saugpapier von noch anhaftendem Aqua bidest. bzw. Inkubationsmedium befreit und dann mit einer Analysenwaage (Sartorius Werke, Typ 2253) gewogen.

Das Resultat wurde mit der Einheit 'mg Feuchtgewicht' bezeichnet.

2.4.4. Definition der g-Strophanthin-Intoxikation am schlagenden Präparat

Die Zeichen der Intoxikation des stimulierten, schlagenden Purkinje-Fadens bzw. Moderatorbandstreifens durch g-Strophanthin waren den Kontraktionskurven zu entnehmen:

- 1) Abfall der kontraktilen, systolischen Kraft, eventuell bis zum Vollbild einer Kontraktur, nachdem ein positiv inotroper Effekt des Glykosids meßbar war. Der Kraftverlust mußte dabei größer sein als der natürliche Abnutzungseffekt, der bei 120-minütiger Stimulation ohne Zugabe von g-Strophanthin eintrat.
- 2) Arrhythmien jeglicher Form, ob singulär oder in Salven.

2.4.5. Messung von (^3H)-g-Strophanthin-Bindung und glykosidkonzentrationsabhängiger Kontraktionskraft

Nach Erreichen eines Äquilibriums der schlagenden Purkinjefasern bzw. der Moderatorbandstreifen, frühestens aber nach 60 min, wurde (^3H)-g-Strophanthin (ca. $1.2 \times 10^{-8} \text{ M} = \text{ca } 1.8 \times 10^{-7} \text{ cpm}$) dem Inkubat zugegeben und gleichzeitig durch va-

riable Mengen unmarkierten g-Strophanthins die Glykosidmengen auf die zu untersuchenden Konzentrationen ergänzt.

Die Entwicklung der Kontraktionskraft wurde kontinuierlich aufgezeichnet und nach 120 min die g-Strophanthin-haltige Krebs-Henseleit-Lösung rasch abgelassen, das Präparat von den Haken genommen, 30 sec lang mit Aqua bidest. gespült und nach 2.4.3. das Feuchtgewicht bestimmt.

Nach Auflösung des Präparates in 0.5 ml Soluene 350 (Fa. Packard, Zürich, Schweiz) bei 60 °C nach 2 - 4 h und nach Zugabe von 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Unisolve 1, Koch-Light Laboratories, W. Zinsser, Frankfurt a. M.) wurde die Radioaktivität in einem Szintillationszähler (Betaszint BF 5000) gemessen.

Dabei wurde die Radioaktivität als "counts per minute" (cpm) im Vergleich zu einem externen Standard gemessen.

2.4.5.1. Definition der unspezifischen Bindung von (³H)-g-Strophanthin

Im Versuch wurde wie oben beschrieben verfahren und $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ unmarkiertes g-Strophanthins zugegeben.

Bei dieser Konzentration konnten ausnahmslos die Zeichen der Glykosidintoxikation mit dem Zusammenbruch der systolischen Kraft in den Konzentrationskurven beobachtet werden.

Aus den konzentrationsabhängigen Bindungsversuchen mit schlagenden Purkinjefasern bzw. Moderatorbandstreifen (Abb. 36) ging hervor, daß bereits bei $3 \times 10^{-6} \text{ M}$ g-Strophanthin ca 90 % der glykosidempfindlichen Bindungsstellen besetzt wurden und damit bereits vor der gemessenen Konzentration von $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ eine vollständige Okkupation hochwahrscheinlich erreicht war.

Die hier gemessene Radioaktivität erfolgte demnach über Bindungen, die nicht durch g-Strophanthin spezifisch hemmbar waren, und konnte deswegen als "unspezifische" Bindung bezeichnet werden. Damit kann jedoch nicht die Existenz eines spezifischen Rezeptors ausgeschlossen werden, an dem dann die so gemessene Bindung stattfände, dessen Affinität zu Herzglykosiden jedoch äußerst gering wäre - was wiederum der Regel widerspräche, daß spezifische Pharmakon-Rezeptoren eine hohe Affinität zu den Pharmakon-Molekülen besitzen.

2.4.5.2. Bestimmung der (^3H)-g-Strophanthin-Radioaktivität im Inkubationsmedium

Um die gesamte, in 75 ml Versuchslösung gebrachte (^3H)-g-Strophanthin-Radioaktivität zu bestimmen, wurde - bei jedem Versuch - 50 μl Medium entnommen, 10 ml Szintillationsflüssigkeit zugegeben und die Radioaktivität im Szintillationszähler gezählt.

Dieser Wert mit dem Faktor 1500 multipliziert ergab die gesamte, in diesem Versuch in Lösung befindliche Radioaktivität in der Einheit cpm.

2.4.6. Messung der zeitabhängigen $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme

2.4.6.1. Bestimmung der zeitabhängigen, gesamten $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme

Präparation und Äquilibrierungsphase wie in 2.4.2.

Parallel zur Äquilibrierungsphase des stimulierten Präparates - nach ca. 45 min - wurde in einem zweiten Wasserbad (Braun Melsungen AG, Typ 851502) in einem Becherglas 75 ml Krebs-Henseleit-Lösung (pH 7.4) auf $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt und kontinuierlich mit Carbogen begast.

Ca. 5 μCi (= ca. 1×10^7 cpm) $^{86}\text{Rb}^+\text{Cl}$ (spezifische Aktivität 0.9 - 4.6 mCi/mg; Amersham Buchlar, Braunschweig) wurden hinzugegeben und die so angesetzte Lösung zum Zwecke der bestmöglichen Verteilung des $^{86}\text{Rb}^+$ frühestens nach 15 min weiterverwendet.

Nach dem Ende der Äquilibrierungszeit des Präparates wurde die hierfür verwendete Lösung rasch abgelassen und durch das $^{86}\text{Rb}^+$ -haltige Inkubationsmedium ersetzt.

Ein vollständiger Wechsel des Inkubationsmediums wurde der alleinigen Zugabe von $^{86}\text{Rb}^+$ in die Krebs-Henseleit-Lösung bei schlagendem Präparat vorgezogen, nachdem Vorversuche ergeben hatten, daß dadurch eine wesentlich höhere Exaktheit und Reproduzierbarkeit der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme erreicht werden konnte.

Das schlagende Präparat wurde nun für die angegebene Dauer des Versuches (7 - 30 min) inkubiert und die Kontraktionskraft laufend aufgezeichnet.

Danach wurde die $^{86}\text{Rb}^+$ -haltige Lösung rasch entfernt und das Präparat 30 sec lang mit eiskaltem Aqua bidest. abgespült, gewogen, aufgelöst und die Radioaktivität bestimmt. Die gesamte $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme wurde als 'counts per minute' pro mg Feuchtgewicht (cpm/mg) ausgedrückt.

2.4.6.2. Bestimmung der zeitabhängigen, unspezifischen $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme

Präparation und Äquilibrierungsphase wie in 2.4.2.

Parallel zur Äquilibrierungsphase des sich kontrahierenden Präparates wurde wie in 2.4.6. ein zweites Inkubationsmedium angesetzt. Neben ca. 5 μCi $^{86}\text{Rb}^+$ wurde nun noch $1 \times 10^{-4}\text{M}$ g-Strophanthin hinzugegeben und die Lösung frühestens nach 15 min weiterverwendet.

Nach dem Ende der Äquilibrierungszeit des Präparates wurde diesem $1 \times 10^{-4}\text{M}$ g-Strophanthin zugegeben.

Nach Eintritt des toxischen Effektes - nach ca. 4 min - wurde die strophanthinhaltige Lösung rasch durch das strophanthin- und $^{86}\text{Rb}^+$ -haltige Medium ersetzt und das Präparat für die Dauer des jeweiligen Versuches (7 - 30 min) inkubiert.

Danach wurde die $^{86}\text{Rb}^+$ - und strophanthinhaltige Lösung abgelassen und mit dem Präparat zur Bestimmung der Radioaktivität nach 2.4.5 weiterverfahren.

Aus den konzentrationsabhängigen $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme-Versuchen am schlagenden Präparat ging hervor, daß bei einer $3 \times 10^{-6}\text{M}$ g-Strophanthin-Konzentration die aktive $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme nahezu vollständig gehemmt wurde.

Eine $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme, die bei einer Konzentration von $1 \times 10^{-4}\text{M}$ g-Strophanthin stattfand, erfolgte demnach nicht mehr über eine $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase, die durch g-Strophanthin spezifisch hemmbar war, und konnte demzufolge als unspezifisch bezeichnet werden.

Die unspezifische $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme wurde als cpm/mg Feuchtgewicht gemessen.

2.4.6.3. Bestimmung der zeitabhängigen, spezifischen $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme

Die spezifisch aufgenommene Menge an $^{86}\text{Rb}^+$ (cpm/mg Feuchtgewicht) ergab sich durch Subtrahieren der während einer gewissen Zeitspanne aufgenommenen Radioaktivität von der während des gleichen Zeitraumes aufgenommenen Gesamtradioaktivität.

2.4.6.4. Messung der $^{86}\text{Rb}^+$ -Radioaktivität im Inkubationsmedium

Um die gesamte, in 75 ml Versuchslösung gebrachte $^{86}\text{Rb}^+$ -Radioaktivität zu bestimmen, wurde - bei jedem Versuch und während das Präparat inkubiert wurde - 50 μl Medium entnommen, 1 ml Szintillationsflüssigkeit zugegeben und die Radioaktivität bestimmt. Dieser Wert mit dem Faktor 1500 multipliziert ergab die gesamte, in diesem Versuch in Lösung befindliche Radioaktivität in der Einheit cpm.

2.4.7. Messung der g-Strophanthin-konzentrationsabhängigen $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme

Präparation und Äquilibrierungsphase wie in 2.4.2.

Parallel zur Äquilibrierungsphase des stimulierten Präparates - nach ca. 45 min - wurde in einem zweiten Wasserbad ein zweites Inkubationsmedium angesetzt.

Neben ca. 5 μCi $^{86}\text{Rb}^+$ wurde noch die g-Strophanthin-Konzentration des jeweiligen Versuches hinzugegeben und das Inkubationsmedium zum Zwecke einer bestmöglichen Verteilung des $^{86}\text{Rb}^+$ und g-Strophanthins frühestens nach 15 min weiterverwendet.

Nach dem Ende der Äquilibrierungszeit des Präparates wurde die g-Strophanthin-Konzentration des jeweiligen Versuches zugegeben. Das Kontraktionsverhalten des Präparates wurde weiterhin bis zum Ende des Versuches aufgezeichnet.

Nach Erreichen des maximalen Kontraktionseffektes - für g-Strophanthin-Konzentrationen bis $8 \times 10^{-8}\text{M}$ jedoch maximal nach 120 min Inkubationszeit - wurde das Inkubationsmedium rasch durch das g-strophanthin- und $^{86}\text{Rb}^+$ -haltige Medium ersetzt.

Nach exakt 15 min Inkubationszeit wurde die g-strophanthin- und $^{86}\text{Rb}^+$ -haltige Lösung abgelassen, das Präparat 30 sec lang mit eiskaltem Aqua bidest. abgespült, gewogen, aufgelöst und die Radioaktivität bestimmt.

Die Bestimmung der im Inkubationsmedium maximal vorhandenen $^{86}\text{Rb}^+$ -Radioaktivität erfolgte nach 2.4.6.4.

3. RESULTATE

3.1. (³H)-g-Strophanthin-Bindung an isolierte Zellmembranen des Schafmyokards

3.1.1. Vorbemerkung

Die ersten Experimente, die die Bindung von Herzglykosiden an Gewebe mit Hilfe der Bindung von radioaktiv markiertem Glykosid an isolierten Zellmembranen untersuchten, wurden von Schwartz und Matsui (174, 175) mit Tritium-markiertem (³H)-Digoxin als Radioligandem durchgeführt. Es folgten zahlreiche weitere Studien, in denen auch (³H)-g-Strophanthin Verwendung fand (6, 61, 64).

Nachdem gezeigt werden konnte, daß Herzglykoside an Zellmembranen binden, wurden diese Bindungsstellen, die eng mit der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität verknüpft sind, als pharmakologische Rezeptoren für Herzglykoside postuliert (12, 99, 220).

Um eine Bindungsstelle Rezeptor nennen zu können, müssen jedoch bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein:

Ein Rezeptor muß eine Affinität zu einem Substrat haben, die angemessen hoch ist im Verhältnis zur verfügbaren Konzentration des Substrates. Um das Substrat diskriminieren zu können, muß der Rezeptor die Eigenschaft der Spezifität besitzen, d. h. eine vergleichsweise geringe Affinität für möglicherweise "irreführende" Substanzen.

Beinhaltet die spezifische, reversible Bindung ("Corpora non agunt nisi fixata", Paul Ehrlich, 1909) mit hoher Affinität auch einen essentiellen Teil des Rezeptors als Ort des "Erkennens" und der "Diskriminierung", so definiert sie ihn nur unvollständig: Vielmehr muß durch den Rezeptor auch die Information der gebundenen Substanz transferriert werden (z. B. in die Zelle) und daraus eine entsprechende Antwort (biologischer Effekt) resultieren (Smythies und Bradley, 299):

	Zwischenschritte	
S + R	SR - - - - - +	Effekt

Da ein spezifischer Rezeptor immer in einer endlichen Anzahl vorhanden sein wird, muß eine Substrat-Rezeptor-Bindung sättigbar sein (219).

Demgegenüber liegen unspezifische Bindungen vor, wenn eine Bindung sich als nicht sättigbar erweist.

Bei Bindungsstudien wurden verschiedene Verfahren entwickelt, um den spezifischen vom unspezifischen Anteil an der Gesamtbindung zu differenzieren. Die unspezifische Bindung kann quantitativ erfaßt werden, indem man die Radioliganden-Bindung untersucht an Gewebepreparationen,

- die durch Hitze denaturiert wurden
(Zerstörung spezifischer Rezeptoren)
- in denen die Affinität des Rezeptors zum
Substrat maximal reduziert wurde (z. B.
bei Glykosidrezeptoren durch Gabe von NaCl)
- in Gegenwart von größeren Mengen des unmarkierten Liganden.

Das letztgenannte Verfahren wird vielfach (u. a. auch in dieser Studie) angewendet und geht von dem Grundgedanken aus, daß alle spezifischen Bindungsstellen, die per definitionem sättigbar sind, hochwahrscheinlich von dem hohen Überschuß an unmarkierten Liganden besetzt werden, jedoch an die unspezifischen, nicht sättigbaren Bindungsstellen auch markierte Liganden binden werden. Eine unter diesen Umständen gemessene Radioaktivität ist Ausdruck des Anteiles der unspezifischen Bindung an der Gesamtbindung.

In Bindungsstudien mit radioaktiv markierten Substanzen hat sich - auch auf Grund der relativ leichten Durchführbarkeit - die Methodik der raschen Filtration durchgesetzt (151), bei der die Gewebeteile und mit ihnen die gebundene Radioaktivität an einem Filter haften bleiben. Gerade dieses Verfahren macht eine sorgfältige Kontrolle der Ergebnisse auf Spezifität erforderlich, da die Radioliganden auch an die Glaswände der Behältnisse, an die Glasfilter, subzelluläre Partikel etc. binden können (52). Dabei gilt der Grundsatz, daß je lipophiler eine verwendete Substanz, um so größer auch die Bindung an unspezifische Membrankomponenten ist.

Für g-Strophanthin konnte gezeigt werden, daß es fast ausschließlich an spezifische Bindungsstellen sowohl in isolierten Zellmembranpreparationen (ca. 97 %) als auch in Zellhomogenaten des Herzmuskels (ca. 80 %) des Menschen bindet (72,

178). Deshalb, und auch auf Grund der Tatsache, daß das hydrophile g-Strophanthin relativ leicht in Lösungen zu handhaben ist, wird es von vielen Autoren - wie auch in dieser Arbeit - als Herzglykosid für Bindungsstudien bevorzugt.

In den folgenden Versuchen wurde an isolierten Zellmembranen des Schafherzens untersucht, ob die genannten Voraussetzungen erfüllt werden, um von spezifischen Herzglykosidrezeptoren sprechen zu dürfen, und wie sich pharmakodynamisch und -kinetisch die Glykosidbindung und der Rezeptor charakterisieren lassen.

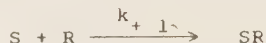
Die Aufarbeitung von Herzmuskelgewebe zu isolierten Zellmembranen diente dabei einerseits der Isolierung und Anreicherung von Zellmembranen und glykosidspezifisch hemmbaren ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPasen, andererseits der Eliminierung intra- und interzellulärer, die selektive (^3H)-g-Strophanthin-Bindung beeinflussender Faktoren.

Dies führte in den Versuchen mit isolierten Zellmembranpräparationen des linken Schafherzventrikels zu einer relativ hohen ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität [$0.15 - 0.50 \mu\text{mol ATP hydrolysiert/min/mg Protein}$ (= U/mg Protein) bei 37°C] und einem hohen Anteil ($70 - 96\%$) an glykosidspezifisch hemmbarer ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase im Verhältnis zu der Gesamt- ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität. Dem entsprach im Bindungsverhalten ein äußerst geringer Anteil an unspezifischer (^3H)-g-Strophanthin-Bindung, der in der Regel im Promille-Bereich lag und nur ausnahmsweise - bei Versuchen mit niedriger Inkubationstemperatur (10°C) und dabei ohnehin nur geringer (^3H)-g-Strophanthin-Bindung - bis zu 3.5% der Gesamtbindung betrug. Bei der Arbeit mit isolierten Zellmembranen geht man davon aus, daß in aliquoten Mengen auch die gleichbleibende Menge von Membranpartikeln - und damit Rezeptoren - vorhanden ist [indirekt bestimmbar durch die Messung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität aliquoter Teile]. Die Bindung von g-Strophanthin (radioaktiv markiert oder unmarkiert) an diese Membranen ist nur unter bestimmten Inkubationsvoraussetzungen möglich und optimierbar und erfolgte deshalb zu den in 2.3 dargelegten Bedingungen (pH, Temperatur, Ionenzusammensetzung des Mediums).

3.1.2 Grundlagen der Substrat-Rezeptor-Reaktion

Die Bindung eines Substrates (S) an den Rezeptor (R) zum Substrat-Rezeptor-Komplex (SR) läßt sich durch das Massenwirkungsgesetz (44) beschreiben. Es gilt:

Gleichung 1



Dies besitzt auch für g-Strophanthin Gültigkeit (18, 114, 219).

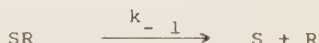
Die Rate, mit der diese Reaktion fortschreitet, ist eine Funktion der Konzentration des Substrates (S), des Rezeptors (R) und der reaktionsspezifischen Konstanten, k_{+1} (= Assoziationsgeschwindigkeitskonstante):

Gleichung 2

$$\text{Rate der Vorwärtsreaktion (Assoziation)} = k_{+1}(S)(R)$$

Erfolgt eine Substrat-Bindung reversibel, so kann die Dissoziation unter Beachtung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten, k_{-1} , in ähnlicher Weise wie in Gleichung 1 ausgedrückt werden:

Gleichung 3



Die Dissoziation hängt alleine von der Konzentration des Substrat-Rezeptor-Komplexes und der Konstanten k_{-1} ab:

Gleichung 4

$$\text{Rate der Rückwärtsreaktion (Dissoziation)} = k_{-1} (SR)$$

k_{+1} und k_{-1} sind "Wahrscheinlichkeitsfaktoren". Wenn sich solch ein System (bestehend aus S, R und SR) im Gleichgewichtszustand befindet, dissoziiert hochwahrscheinlich ein Komplex in Substrat und Rezeptor, wenn sich ein Substrat und ein Rezeptor assoziieren.

Somit sind im Äquilibrium die Raten der Vorwärts- und Rückwärts-Reaktion gleich:

Gleichung 5

$$k_{+1} (S) \cdot (R) = k_{-1} (SR)$$

oder

Gleichung 6

$$\frac{(S) \cdot (R)}{(SR)} = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = K_D (M)$$

Das Verhältnis von Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante, k_{-1} , zu Assoziationsgeschwindigkeitskonstante, k_{+1} , wird Dissoziationskonstante, $K_D (M)$, genannt.

Ist die Hälfte der Rezeptoren mit dem Substrat besetzt, lassen sich (R) und (S) aus der obigen Gleichung (6) kürzen und es ergibt sich unter diesen Bedingungen:

Gleichung 7

$$K_D = (S)$$

Die freie Konzentration an Substrat, bei der die Hälfte aller Rezeptoren besetzt ist, ist also gleichbedeutend mit der Dissoziationskonstanten, $K_D (M)$.

Dies ist eine hilfreiche Definition der Affinität eines Rezeptors zu seinem Substrat:

Je niedriger diese Konzentration ist, d. h.

je niedriger die K_D ist, um so höher ist die Bindungsaffinität.

Experimentell läßt sich die Affinität des Rezeptors zum Substrat nicht nur durch die Bestimmung des Verhältnisses aus Dissoziation und Assoziation ermitteln, sondern auch durch direkte Untersuchung des konzentrationsabhängigen Bindungsverhaltens.

Hierbei wird die Bindung des Substrates in einem Bereich der Substratkonzentration untersucht, der einem Zehntel bis dem Zehnfachen der 50 %-Sättigungskonzentration entspricht.

Bei konstanter Bindungsstellenkonzentration und einer Inkubationszeit, die ausreichend für das Erreichen von Äquilibrierungsbedingungen ist, wird bei steigenden Substratkonzentrationen solange auch mehr Substrat gebunden, bis alle spezifischen Bindungsstellen besetzt, d. h. gesättigt, sind.

Eine weitere Steigerung der Substratkonzentration führt dann zu keiner zusätzlichen, spezifischen Bindung (= Sättigungskinetik). Graphisch dargestellt $\{ \text{Konz. (SR)} / \text{Konz. (S)} \}$ führen diese Ergebnisse zu einer Hyperbel, die sich asymptotisch der maximalen Kapazität der Bindungsstellen annähert.

Die Auftragung nach Scatchard (214) ist eine vielfach angewandte Methode, um die Bindungsaffinität und die Gesamtkonzentration der Bindungsstellen aus solchen Daten zu ermitteln. Hierfür werden die einzelnen Ergebnisse mit Hilfe folgender Gleichungen zusammengefaßt:

Gleichung 8

$$n_{\max} = (\text{SR}) + (\text{R})$$

oder

Gleichung 9

$$(\text{R}) = n_{\max} - (\text{SR})$$

$n_{\max}$ = Anzahl der Bindungsstellen

Greift man nun auf Gleichung 6 zurück und setzt B (Konzentration an gebundenem Substrat) für (SR) und F (Konzentration an freiem Substrat) für (S) ein, so ergibt sich Gleichung 6 als:

Gleichung 10

$$\frac{(B)}{(F)} = \frac{(R)}{K_D}$$

Bei Einsetzen von Gleichung 9 für (R) folgt:

Gleichung 11

$$\frac{(B)}{(F)} = \frac{n_{\max} - (B)}{K_D}$$

oder

Gleichung 12

$$\frac{(B)}{(F)} = - \frac{1}{K_D} \times (B) + \frac{n_{\max}}{K_D}$$

Da in dieser Gleichung K_D und $n_{\max}$ konstant sind, beschreibt die Gleichung 12 gemäß der Formel $Y = mx + b$ eine Gerade.

Die zwei gesuchten Parameter (Rezeptoraffinität und Rezeptorkonzentration) können nun aus der graphischen Auftragung von gebundenem Substrat (Ordinate) zu dem Verhältnis aus gebundenem/freiem Substrat (Abszisse) entnommen werden:

Die Affinität ergibt sich als der negative, inverse Wert der Steigung, m:

$$m = - \frac{1}{K_D} \quad \text{oder} \quad K_D = - \frac{1}{m}$$

Bei genügend hoher Konzentration an freiem Substrat werden alle Rezeptoren besetzt, sodaß gilt:

$$\frac{(B)}{(F)} \xrightarrow{\lim} 0$$

Damit schneidet die Gerade die Ordinate.

Man erhält also die gesamte Rezeptorkonzentration durch Extrapolation der Geraden auf die (B)/(F)-Achse.

Ergibt bei der Auftragung nach Scatchard die Verbindung der Ergebnispunkte eine Gerade, so bedeutet dies, daß die Affinität unabhängig von der Konzentration des Substrates ist. Dies ist ein wichtiges Indiz für das Vorliegen einer einzigen Rezeptorenart im untersuchten Konzentrationsbereich.

Demgegenüber kann zum Beispiel ein gekrümmter Graph auf zwei oder mehr Rezeptorengattungen hinweisen, wobei sich dann die Kurve aus der Summe der Einzelgeraden ergibt (21).

Es kann jedoch auch andere Erklärungsmöglichkeiten geben:

Heterogenität der Bindung von markiertem und unmarkiertem Liganden (127), Kooperativität der Rezeptoren (213), unspezifische Interaktionen oder Ungenauigkeit in der Abschätzung des freien Liganden (40), radioaktive Verunreinigungen (197) oder eine Zwei-Schritt-Ligand-Rezeptor-Interaktion (28).

3.1.3. Zeitabhängige (³H)-g-Strophanthin-Bindung

Als Voraussetzung für g-strophanthin-konzentrationsabhängige Bindungsexperimente war zu untersuchen, in welchem Zeitraum eine Bindung von (³H)-g-Strophanthin erfolgte, ob die Bindung einen Gleichgewichtszustand (= Äquilibrium) erreichen würde und welchen Einfluß die umgebende Temperatur darauf nehmen würde.

Hierfür wurden isolierte Zellmembranpräparationen des linken Schafherzventrikels in gepufferter, Mg²⁺- und P_i-haltiger Lösung mit (³H)-g-Strophanthin für 0 - 24 h bei den angegebenen Temperaturen inkubiert.

Abbildung 5 zeigt, daß die Bindung von (^3H)-g-Strophanthin bei den gemessenen Temperaturen streng zeitabhängig verläuft:

Der steten Zunahme der Substrat-Rezeptor-Komplexe in einer initialen Phase, in der die Assoziation zum Substrat-Rezeptor-Komplex gegenüber der gleichzeitig einsetzenden Komplexdissoziation überwiegt, folgt eine Plateauphase als Ausdruck eines Gleichgewichtszustandes, in dem die Zahl der assoziierenden und dissoziierenden Komplexe sich die Waage halten.

Eine Temperaturabhängigkeit zeigt sich im Zeitraum des Erreichens von Äquilibriumbedingungen, die für niedrigere Temperaturen zunehmend später erfolgten. So stellten sich Gleichgewichtsbedingungen bei 37 °C nach ca. 3 h, bei 30 °C nach ca. 8 h, und bei 20 °C nach ca. 15 h ein. Bei 10 °C Inkubationstemperatur wurde während der Versuchsdauer (24 h) kein Äquilibrium erreicht, doch ergaben weitere Versuche (nicht aufgeführt), daß wahrscheinlich nach ca. 35 - 48 h ein Gleichgewichtszustand erreicht war.

Ein Temperatureffekt konnte auch für die Höhe des Plateaus nachgewiesen werden, da sich bei niedrigeren Temperaturen ein Gleichgewicht auf einem zahlenmäßig höheren Bindungsniveau einstellte. Dieser Befund wurde mit den Ergebnissen aus späteren Versuchen erklärbar, die eine Erniedrigung der Rezeptoraffinität bei Verringerung der Inkubationstemperatur überwiegend auf eine Erniedrigung der Dissoziationsrate zurückführten - folglich bei niedrigeren Temperaturen zahlenmäßig mehr Komplexe assoziiert blieben.

Bereits diese erste Versuchsreihe zeigt deutlich die hohe Spezifität der (^3H)-g-Strophanthin-Bindung auf:

Die unspezifische Bindung - gemessen als Bindung in der Anwesenheit von 10^{-3}M g-Strophanthin - liegt bei Werten um 0.006% der Gesamtbindung (Ausnahme: bei 10 °C Inkubationstemperatur wurde ein einmaliger Wert von 3.5 % der Gesamtbindung erreicht).

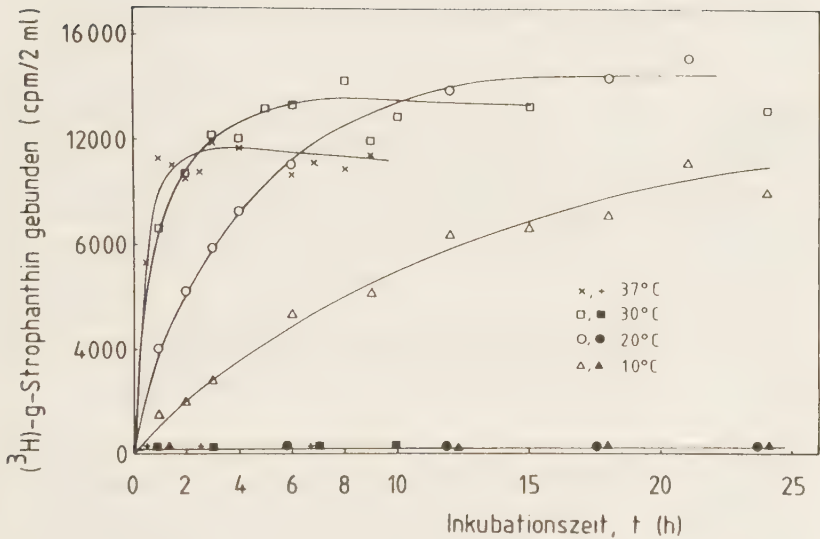


Abbildung 5:

Zeitabhängige (^3H)-g-Strophanthin-Bindung an isolierte Zellmembranen des linken Schafherzventrikels bei unterschiedlichen Temperaturen.

Isolierte Zellmembranen [0.28 mg Membranprotein, ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität 0.42 μmol ATP hydrolysiert/min/mg Protein, ca. 86 % spezifische Aktivität] wurden für unterschiedliche Dauer (0 - 24 h) bei Temperaturen von 10 °, 20 °, 30 °, und 37 °C inkubiert in 3mM MgCl_2 , 3mM Imidazol/ PO_4 , 50mM Imidazol/HCl, pH 7.25 und $1 \times 10^{-9}\text{M}$ (^3H)-g-Strophanthin. Gesamtvolumen 2 ml. Bestimmung der proteingebundenen Radioaktivität nach rascher Filtration (Glasfaserfilter). Die offenen Symbole (□, ○, △) und x markieren die Gesamtbindung unter diesen Bedingungen, die ausgefüllten Symbole (■, ●, ▲) und + die unspezifische Bindung in der Anwesenheit von $1 \times 10^{-3}\text{M}$, unmarkiertem g-Strophanthin. Unspezifische Bindung < 0.007 % der Gesamtbindung, Ausnahme: 3.5 % bei 10 °C.

3.1.4. Kinetische Konstanten der (^3H)-g-Strophanthin-Bindung an isolierte Zellmembranen

3.1.4.1. Temperaturabhängige Assoziationsgeschwindigkeitskonstante, k_{+1}

Eine reversible Substrat-Rezeptor-Reaktion, die dem Massenwirkungsgesetz gehorcht, läßt sich in ihrer Komplex-Assoziation bzw. Komplex-Dissoziation und den thermodynamischen Eigenschaften der Substrat-Bindung durch die Ermittlung der Umsatz-Raten, d. h. der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten, k_{+1} , bei verschiedenen Temperaturen beschreiben.

Verschiedene Untersuchungen konnten Evidenz erbringen, daß die Formation eines g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes einer zeit- und temperaturabhängigen, bimolekularen Reaktion 2.Ordnung folgt (76).

Sind die initiale g-Strophanthin-Konzentration (a) und die initiale freie Bindungsstellenkonzentration (b, ermittelt aus der Auftragung der konzentrationsabhängigen Bindungsdaten nach Scatchard) bekannt, so berechnet sich aus der experimentell zu bestimmenden Anzahl der Substrat-Rezeptor-Komplexe (x) zur Reaktionszeit, t, die Rate der Assoziation - die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante, k_{+1} - nach der Gleichung 2.Ordnung (64, 69):

$$k_{+1} = \frac{2.303}{(a-b) \cdot t} \times \log \frac{b \cdot (a-x)}{a \cdot (b-x)} \quad (\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1})$$

Sind die oben genannten Voraussetzungen erfüllt, so ergibt die Verbindung der Wertepunkte eine Gerade, während biphasische oder gekrümmte Graphen zum Beispiel auf Heterogenität der Bindungsstellen oder ligandeninduzierte Bindungsstellenkooperation hinweisen.

Abbildung 6 A bestätigt die Zeit- und Temperaturabhängigkeit der (^3H)-g-Strophanthin-Bindung an isolierte Schafherzzellmembranen des linken Ventrikels:

Mit Verlängerung der Inkubationszeit nimmt auch die Zahl der (^3H)-g-Strophanthin-Rezeptor-Bindungen zu.

Je niedriger die Inkubationstemperatur ist, um so länger dauert es, bis eine bestimmte Menge an Glykosid-Rezeptor-Bindungen erreicht ist, d. h. mit fallenden Temperaturen nimmt auch die Umsatzrate der Assoziationen ab.

Die Linearität der Bindungskinetik (Korrelationskoeffizient, $R > 0.98$) weist die Bindungsreaktion für alle untersuchten Temperaturen als bimolekularen Prozess aus. Die aus dem Anstieg der Bindungsgeraden errechneten Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten, k_{+1} , bei den gemessenen Temperaturen sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

3.1.4.2. Temperaturabhängige Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante, k_{-1}

Bereits die Versuche zur zeitabhängigen Bindung ließen durch das Erreichen eines Gleichgewichtszustandes auf eine gleichzeitig stattfindende Dissoziation und damit auf eine eventuelle Reversibilität der (^3H)-g-Strophanthin-Bindung schließen.

Reversibilität ist eine wichtige Voraussetzung für eine einfache, monomolekulare Reaktion und das Fehlen einer vollständigen Dissoziation muß die Möglichkeit der Irreversibilität in Erwägung ziehen.

Da die Dissoziation einer Reaktion 1.Ordnung gehorcht, ist die Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten, k_{-1} , weitaus weniger kompliziert als die der Assoziationskonstanten.

Sie errechnet sich aus der Gleichung:

$$k_{-1} = \frac{0.693}{t_{1/2}} \quad (\text{sec}^{-1})$$

$t_{1/2}$ = Reaktionszeit, t , bei der 50 % der Substrat-Rezeptor-Komplexe dissoziiert sind.

Die Dissoziation kann gemessen werden, indem man selektiv die gleichzeitig erfolgende Assoziation, die auch nach Erreichen des Äquilibriumms stattfindet, hemmt.

Diese Vorwärtsreaktion kann durch Zugabe eines kompetitiven Liganden (Agonist oder Antagonist) in einer Konzentration, die ausreicht, um mindestens 99 % des radioaktiven Liganden zu verdrängen, gehemmt werden.

Im Rahmen dieser Methode wurde (^3H)-g-Strophanthin bis zum Erreichen von Gleichgewichtsbedingungen mit isolierten Zellmembranen bei verschiedenen Temperaturen inkubiert, durch Zentrifugation die markierten Glykosid-Membran-Komplexe vom freien (^3H)-g-Strophanthin-Anteil getrennt und diese dann bei verschiedenen Temperaturen mit einer vergleichsweise großen Menge an unmarkiertem g-Strophanthin ($1 \times 10^{-4}\text{M}$) in Lösung gebracht.

Bei diesen hohen Konzentrationen an unmarkierten Liganden wird jede, durch Dissoziation des radioaktiven Liganden freiwerdende Bindungsstelle hochwahrscheinlich von einem unmarkierten Liganden besetzt, sodaß mit steigender Inkubationszeit der membrangebundene Anteil an g-Strophanthin ab-, der freie Anteil zunimmt. Die Abnahme und damit die Reversibilität der (^3H)-g-Strophanthin-Bindung als Funktion der Reaktionszeit, t , zeigt für Temperaturen von 10°C - 37°C an isolierten Zellmembranen des Schafmyokards Abbildung 6 B. Mit zunehmender Reaktionszeit sind bei gleicher Inkubationstemperatur immer weniger Glykosid-Rezeptor-Komplexe vorhanden. Die Dissoziation erfolgt bei Erniedrigung der Temperatur immer langsamer, d. h. die Umsatzrate wird geringer. So waren 50 % der im Äquilibrium vorhandenen Glykosid-Rezeptor-Komplexe bei 37°C nach 85 min dissoziiert, während diese Halbwertszeit bei 20°C ca. 35.5 h und bei 10°C sogar ca. 14 Tage betrug.

Die Dissoziation von (^3H)-g-Strophanthin von Zellmembranen des Schafherzens ist demnach streng zeit- und temperaturabhängig. Die Linearität der halblogarithmischen Auftragung, deren Steigung die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante, k_{-1} , darstellt (Tabelle 3), weist in allen untersuchten Temperaturbereichen die Dissoziation als Reaktion 1. Ordnung aus.

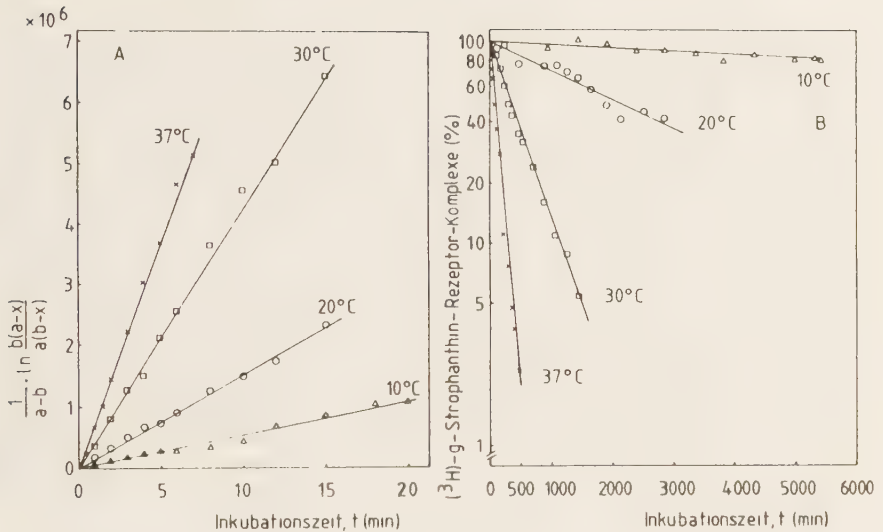


Abbildung 6:

Zeitabhängige Assoziation (A) und Dissoziation (B) von (^3H) -g-Strophanthin an isolierten Zellmembranen des linken Schafherzventrikels

A: Isolierte Zellmembranen [0.18 mg Membranprotein, $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität 0.16 U/mg Protein, ca. 83 % spezifische Aktivität] wurden bei verschiedenen Temperaturen (10 °C - 37 °C) unterschiedlich lange (0 - 20 min) in 3mM MgCl_2 , 3mM Imidazol/ PO_4 , 50mM Imidazol/HCl, pH 7.25 und $1 \times 10^{-9}\text{M}$ (^3H) -g-Strophanthin inkubiert. Gesamtvolumen 2ml. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Membranenzyms gestartet und durch rasche Filtration (Glasfaserfilter) beendet.

Die Bindungsdaten (cpm) wurden in die Gleichung 2.Ordnung eingesetzt und in Abhängigkeit von der Inkubationszeit, t (min), aufgetragen. In dieser Gleichung bedeuten:

a = (^3H) -g-Strophanthin-Ausgangskonzentration (2.8 nM)

b = Ausgangskonzentration des freien Rezeptors (0.63 nM)

x = experimentell bestimmte Anzahl der (^3H) -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexe (cpm) nach der Inkubationszeit, t (min).

Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten, k_{+1} , bei den verschiedenen Temperaturen wurden aus den Steigungen der Geraden berechnet und betrugen bei diesem Experiment:

$k_{+1} = 1.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ (37 °C), 7.15×10^4 (30 °C),
 2.47×10^4 (20 °C) und 9.18×10^3 (10 °C).
 Korrelationskoeffizient der Geraden, $R > 0.99$.

B: Isolierte Zellmembranen (6.3 mg Protein, entsprechend 3.5 ml) derselben Präparation wie in A wurden bei verschiedenen Temperaturen (10 °C - 37 °C) bis zum Erreichen von Äquilibriumbedingungen (37 °C, 5 h; 30 °C, 12 h; 20 °C, 24 h; 10 °C, 48 h) in 3mM MgCl_2 , 3mM Imidazol/ PO_4 , 50mM Imidazol/HCl, pH 7.25 und $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ (^3H)-g-Strophanthin inkubiert - Gesamtvolumen 6.0 ml - und danach der freie vom protein-gebundenen Anteil der Liganden durch Zentrifugation (100 000 g, 30 min) getrennt. Das Sediment wurde in 6.0 ml kaltem Aqua bidest. homogenisiert und aliquote Anteile in 3mM MgCl_2 , 3mM Imidazol/ PO_4 , 50mM Imidazol/HCl, pH 7.25 und $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ g-Strophanthin bei den verschiedenen Temperaturen unterschiedlich lange inkubiert. Gesamtvolumen 2 ml. Die Reaktion wurde durch rasche Filtration (Glasfaserfilter) gestoppt. Die ermittelten (^3H)-g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexe (cpm) wurden halblogarithmisch in Abhängigkeit von der Inkubationszeit, t (min), aufgetragen.

Aus der negativen Steigung der Dissoziationsgeraden lassen sich die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{-1} berechnen, die bei diesem Experiment $1.4 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ (Temperatur 37 °C, Korrelationskoeffizient der Geraden, $R > 0.99$), 3.3×10^{-5} (30 °C, $R > 0.99$), 5.4×10^{-6} (20 °C, $R > 0.97$), und 5.9×10^{-7} (10 °C, $R > 0.81$) betrugen.

3.1.5. Konzentrationsabhängige (^3H)-g-Strophanthin-Bindung - temperaturabhängige Dissoziationskonstante, K_D

Zur direkten Bestimmung der Dissoziationskonstanten, K_D , und ihrer Temperaturabhängigkeit wurden bis zum Erreichen von Äquilibriumbedingungen isolierte Zellmembranen des linken Schafherzventrikels bei Temperaturen von 10 °C - 37 °C in einem Mg^{2+} - und P_i -haltigen Medium mit einer konstanten Menge (^3H)-g-Strophanthin und ansteigenden Konzentrationen g-Strophanthin inkubiert.

Abbildung 7 A zeigt exemplarisch die konzentrationsabhängige (^3H)-g-Strophanthin-Bindung bei 37 °C:

Die Glykosidbindung folgt einer Sättigungskinetik, indem sie sich mit steigenden Konzentrationen asymptotisch der maximalen Bindungsstellenbesetzung (Bindungskapazität) annähert, und ist spezifisch (unspezifische Bindung = 0.002 % der Gesamtbindung).

In der Auftragung derselben Bindungsdaten nach Scatchard (Abbildung 7 B) deutet die Linearität des Graphen auf die Existenz einer einzigen Bindungsstellenart hin.

In den anderen untersuchten Temperaturbereichen erfolgte die Glykosidbindung prinzipiell gleich, d. h. sättigbar, spezifisch und an eine einzige Bindungsstellenart, jedoch mit veränderter Affinität, die sich aus den negativen Steigungen der Verbindungsgeraden in den Auftragungen nach Scatchard als Dissoziationskonstante, K_D , ermitteln ließ.

Diese Dissoziationskonstanten für verschiedene Temperaturen sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. (Die unerwartet hohen K_D -Werte bei niedrigen Temperaturen werden noch zu diskutieren sein.)

Die relativ niedrige Dissoziationskonstante bei 37 °C ($K_D = 1.9 \times 10^{-9} \text{ M}$) deutet auf eine hohe Affinität des Schafmyokards für g-Strophanthin hin.

Es wurde bereits erwähnt, daß die Dissoziationskonstante, K_D , auch definiert ist durch das Verhältnis von Dissoziations- und Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten:

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} \quad (M)$$

Aus Tabelle 3 wird ersichtlich, daß beide Geschwindigkeitskonstanten bei Erniedrigung der Temperatur reduziert werden, sich dieser Effekt auf die Dissoziation jedoch stärker auswirkt. Bei Erniedrigung der Temperatur führt dies dementsprechend zu einer Abnahme der Dissoziationskonstanten, K_D , d. h. die Affinität der Membranbindungsstelle für g-Strophanthin nimmt zu.

Ein Vergleich der K_D -Werte, die durch das Verhältnis von k_{-1} zu k_{+1} bestimmt sind, mit denen, die sich aus der konzentrationsabhängigen (3H)-g-Strophanthin-Bindung nach Scatchard ergeben, zeigt eine gute Übereinstimmung beider Werte im Rahmen des meßtechnisch Möglichen bei 37 °C. Bei niedrigen Temperaturen, speziell bei 10 °C und 20 °C zeigt sich eine Diskrepanz, die prinzipiell den Verdacht nahelegen muß, daß es sich bei der Bindung nicht um eine einfache Reaktion 2.Ordnung handelt.

Die Versuche zur zeitabhängigen (3H)-g-Strophanthin-Bindung zeigten jedoch bereits die Schwierigkeiten auf, bei niedrigen Temperaturen (besonders bei 10 °C) echte Äquilibriumsbedingungen zu erreichen, sodaß die überhöhten K_D -Werte in den konzentrationsabhängigen Bindungsstudien bei niedrigen Temperaturen am ehesten auf das Fehlen eines Gleichgewichtszustandes zurückzuführen sein dürften.

Ein Vergleich mit Dissoziationskonstanten, die von anderen Spezies unter identischen Bedingungen, ebenfalls an isolierten Zellmembranen des Myokards, bestimmt wurden, zeigt in Tabelle 4, daß das Schaf den digitalisempfindlichen Arten zuzurechnen ist und sich seine Affinität zu g-Strophanthin speziell von der des menschlichen Herzens nur geringfügig im Sinne einer noch etwas höheren Affinität unterscheidet.

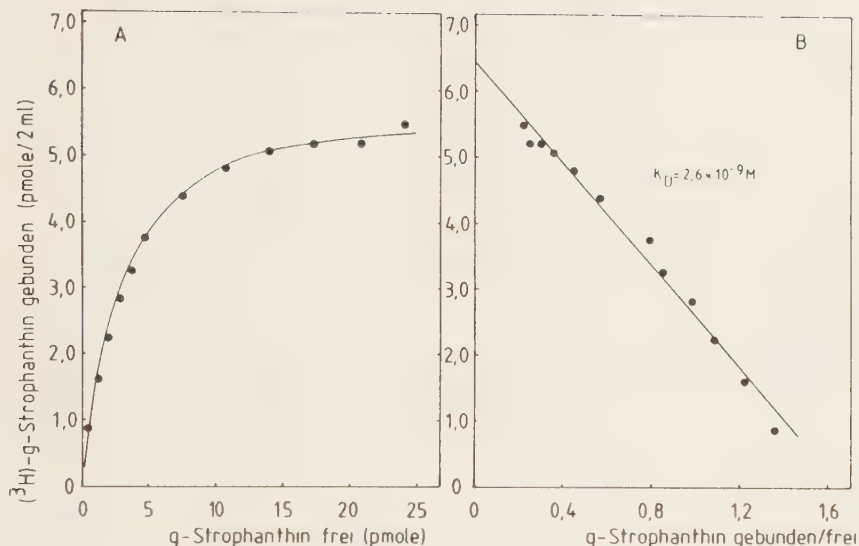


Abbildung 7:

g-Strophanthin-konzentrationsabhängige (^3H) -g-Strophanthin-Bindung an isolierte Zellmembranen des linken Schafherzventrikels

Zellmembranen [0.17 mg Membranprotein, $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität 0.22 μmol ATP hydrolysiert/min/mg Protein, ca. 88 % spezifische Aktivität] wurden für 5 h bei 37 °C in 3mM MgCl_2 , 3mM Imidazol/ PO_4 , 50 mM Imidazol/HCl, pH 7.25, $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ (^3H) -g-Strophanthin⁴ und ansteigenden Konzentrationen 1×10^{-9} - $2 \times 10^{-8} \text{ M}$ nicht radioaktiv markiertem g-Strophanthin inkubiert. Gesamtvolumen 2 ml.

Die Inkubationszeit wurde den Versuchen zur zeitabhängigen Bindung (siehe Abb. 5) entnommen, die proteingebundene Radioaktivität durch rasche Filtration (Glasfaserfilter) bestimmt. Unspezifische Bindung von (^3H) -g-Strophanthin in der Gegenwart von $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ g-Strophanthin = 0.002 %.

In Abb. B wurden die Bindungsdaten aus Abb. A nach der Methode von Scatchard aufgetragen und die Dissoziationskonstante, K_D , dieses Experimentes aus der negativen Steigung der Geraden ermittelt.

Korrelationskoeffizient der Geraden, $R > 0.96$.

Tabelle 3:

Gleichgewichts- und Kinetische Konstanten der (^3H)-g-Strophanthin-Bindung an isolierte Zellmembranen des linken Schafherzventrikels.

Temperatur (°C) / (K)	10 / 283	20 / 293	30 / 303	37 / 310	37 / 310
Inkubations- medium	$\text{Mg}^{2+}, \text{P}_i$	$\text{Mg}^{2+}, \text{P}_i$	$\text{Mg}^{2+}, \text{P}_i$	$\text{Mg}^{2+}, \text{P}_i$	$\text{Na}^+, \text{ATP}, \text{Mg}^{2+}$
$k_{+1} \text{ (M}^{-1}\text{sec}^{-1}\text{)}$	7.2×10^3 (n=2)	$2.5 \pm 0.3 \times 10^4$ (n=3)	$5.7 \pm 1.1 \times 10^4$ (n=5)	$1.2 \pm 0.1 \times 10^5$ (n=5)	$9.2 \pm 0.9 \times 10^4$ (n=5)
$k_{-1} \text{ (sec}^{-1}\text{)}$	1.5×10^{-6} (n=2)	$7.2 \pm 0.7 \times 10^{-6}$ (n=4)	$3.5 \pm 0.3 \times 10^{-5}$ (n=3)	$1.3 \pm 0.1 \times 10^{-4}$ (n=5)	$1.6 \pm 0.1 \times 10^{-4}$ (n=5)
$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} \text{ (M)}$	2.1×10^{-10}	3.0×10^{-10}	6.2×10^{-10}	1.1×10^{-9}	1.7×10^{-9}
$K_D \text{ (Scatchard)}$	1.3×10^{-9} (n=2)	$3.3 \pm 0.4 \times 10^{-9}$ (n=3)	$1.2 \pm 0.2 \times 10^{-9}$ (n=4)	$1.9 \pm 0.2 \times 10^{-9}$ (n=14)	$3.3 \pm 0.3 \times 10^{-9}$ (n=6)

k_{+1} = Assoziationsgeschwindigkeitskonstante, $\bar{x} \pm \text{sem}$
 k_{-1} = Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante, $\bar{x} \pm \text{sem}$
 K_D = Dissoziationskonstante, $\bar{x} \pm \text{sem}$

Tabelle 4:

Gleichgewichts- und Kinetische Konstanten der (³H)-g-Strophanthin-Bindung an isolierte Zellmembranen des Ventrikelmuskards - Vergleich verschiedener Spezies

Spezies	K_D (Scatchard) (M)	k_{+1} (M ⁻¹ sec ⁻¹)	k_{-1} (sec ⁻¹)	$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}}$ (M)
Schaf	$1.9 \pm 0.2 \times 10^{-9}$ (n=14)	$1.2 \pm 0.1 \times 10^5$ (n=5)	$1.3 \pm 0.1 \times 10^{-4}$ (n=5)	1.1×10^{-9}
Mensch (1)	$3.7 \pm 0.2 \times 10^{-9}$ (n=18)	$1.2 \pm 0.1 \times 10^5$ (n=4)	$2.3 \pm 0.2 \times 10^{-4}$ (n=4)	1.9×10^{-9}
Rind (1)	$2.7 \pm 0.1 \times 10^{-9}$ (n=69)	$1.0 \pm 0.1 \times 10^5$ (n=5)	$1.2 \pm 0.1 \times 10^{-4}$ (n=4)	1.2×10^{-9}
Katze (1)	$4.2 \pm 0.2 \times 10^{-9}$ (n=19)	$1.2 \pm 0.1 \times 10^5$ (n=4)	$1.9 \pm 0.2 \times 10^{-4}$ (n=3)	1.6×10^{-9}
Meer- (2) schweinchen	1.18×10^{-7}	4.9×10^4	1.01×10^{-2}	2.06×10^{-7}
Ratte (3)	2.8×10^{-5} 1.05×10^{-7}	4.3×10^4	1×10^{-2} 6×10^{-4}	2.3×10^{-7}

k_{+1} = Assoziationsgeschwindigkeitskonstante, $\bar{x} \pm \text{sem}$ (1) aus: L. Brown, E. Erdmann, 1984 (36)
 k_{-1} = Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante, $\bar{x} \pm \text{sem}$ (2) aus: L. Brown, K. Werdan, E. Erdmann, 1983 (35)
 K_D = Dissoziationskonstante, $\bar{x} \pm \text{sem}$ (3) aus: E. Erdmann, G. Philipp, H. Scholz, 1980 (75)

3.1.6. Konzentrationsabhängige (^3H)-g-Strophanthin-Bindung
- Vergleich der Analysemethoden von Scatchard,
Woelf und Hill

Die vorliegende Arbeit versucht die Glykosidbindung an Gewebe des Schafherzens sowohl in ihrer Qualität - d. h. der Affinität der Bindung - als auch in ihrer Quantität - d. h. der Anzahl der Bindungsstellen - zu charakterisieren.

Da sich das Interesse einiger Forschungsgruppen innerhalb der letzten Jahre auch auf die Frage nach der Existenz mehrerer Rezeptorgattungen innerhalb einer Spezies konzentrierte, und diese an einigen Spezies tatsächlich nachgewiesen werden konnten [Ratte (75), Meerschweinchen (35)] lag es auch in dieser Arbeit nahe, das Bindungsverhalten von g-Strophanthin an Gewebe des Schafherzens unter besonderer Berücksichtigung dieses Aspektes sorgfältig zu untersuchen. Dabei kam die gebräuchliche Methode nach Scatchard zur Anwendung, um zu einer Charakterisierung der Bindungsstelle zu gelangen.

Der entscheidende Vorteil in der Auftragung nach Scatchard liegt einerseits in der relativ leichten Bestimmbarkeit der Dissoziationskonstanten, K_D , - aus der Steigung der Bindungsgeraden - und der Bindungsstellenkonzentration, $B_{\max}$, - durch Extrapolation der Bindungsgeraden auf den Schnittpunkt mit der Y-Achse -; andererseits bietet die Scatchard-Methode eine hohe Sensitivität der graphischen Darstellung, falls die Bindung nicht ausschließlich an eine einzige Bindungsstellenart erfolgt oder sich die einzelnen Bindungen gegenseitig beeinflussen (z. B. durch negative oder positive Kooperativität). In diesen Fällen resultiert ein gekrümmter Graph.

Der Auftragung nach Scatchard sind jedoch auch bestimmte Schwächen und Nachteile immanent (140, 208) und es wurde deshalb versucht, unter Verwendung zweier anderer Methoden - nach Woelf und nach Hill - diese Nachteile auszugleichen und die Resultate aller 3 Analyseansätze miteinander zu vergleichen.

Dabei erhält eine gegebene Anzahl von Bindungsdaten natürlich immer dieselbe Information, unabhängig von der angewandten Methode diese zu interpretieren. Trotzdem können bestimmte

Rechenoperationen oder graphische Auftragungsarten gewisse Aspekte dieser Information klarer hervorheben.

A: Die Auftragung nach Woolf

Wie die Methodik nach Scatchard, so ist auch die Methode nach Woolf [Ligandenkonz. frei/gebunden / Ligandenkonz. frei; Dr. Barnett Woolf, 1932, benannt von Haldane, 1957, (111)] eine lineare Auftragungsart, die von der Michaelis-Menten-Gleichung (1931) abgeleitet wurde und von der die Rezeptorenkonzentration und die Dissoziationskonstante, K_D , abgeschätzt werden können.

Umgekehrt zur Auftragung nach Scatchard läßt sich hier die Rezeptorenkonzentration aus der Steigung des Graphen berechnen und die Dissoziationskonstante resultiert aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse.

Ein - besonders für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit - wichtiger Vorteil der Auftragung nach Woolf liegt in der Betonung bzw. Gewichtung eines unterschiedlichen Konzentrationsbereiches (141):

Sind in der Auftragung nach Scatchard die Wertepunkte der höheren Bindungsstellenbesetzung graphisch relativ zusammengedrängt, so werden sie hier breiter gefächert, während umgekehrt der Konzentrationsbereich geringerer Bindungsstellenbesetzung bei der Methode nach Woolf gedrängt erscheint.

B: Die Auftragung nach Hill

Die Methode nach Hill [log Ligandenkonz. gebunden/frei / log Ligandenkonz. frei; A. V. Hill, 1910, (123)] ist in der Immunologie auch als Sips-Auftragung bekannt und stimmt ebenfalls überein mit der für Redox-Gleichungen verwendeten Auftragung nach Nernst. In der Auftragung nach Hill ergibt sich die Steigung der Verbindungsgeraden als "Hill-Koeffizient", N_H . Im Falle einer einzigen Bindungsstellenart, bei der die Bindungsstellen nicht interagieren, beträgt er 1.

Der Nachteil der Hill-Auftragung ist (53), daß sie die Kenntniss der Bindungsstellenkonzentration voraussetzt. Ebendies

ist jedoch eine der wichtigsten Informationen, die man aus der Scatchard-Auftragung erhält, da man die Rezeptorkonzentration durch Extrapolation aus Daten gewinnt, innerhalb derer eine komplette Sättigung der Bindungsstellen nicht gemessen wurde. Dafür erhält man jedoch mit dem Hill-Koeffizienten einen sehr nützlichen, quantitativen Parameter für das Ausmaß möglicher, kooperativer Interaktionen der Bindungsstellen.

Im Falle positiver Kooperativität werden sowohl in der Hill- als auch in der Scatchard-Auftragung die Verbindungsgraphen gekrümmt. Der Hill-Koeffizient wird > 1 , niemals jedoch größer als die Anzahl der Bindungsstellen pro Makromolekül (53).

Bei Heterogenität oder negativer Kooperativität der Bindungsstellen kann der Scatchard-Graph ebenfalls gekrümmt sein, der Hill-Graph kann linear bleiben, doch wird der Hill-Koeffizient < 1 .

Abbildung 8 und 9 zeigen die beiden Verfahren angewandt auf die (^3H)-g-Strophanthin-Bindung an isolierte Zellmembranen des Ventrikelmyokards des Schafherzens, wobei auf die Bindungsdaten, die in Abbildung 7 mit der Methode nach Scatchard analysiert wurden, zurückgegriffen wurde.

Die Linearität des Graphen nach Woolf zeigt an, daß auch unter Betonung eines Konzentrationsbereiches, der in der Scatchard-Auftragung nur einer vorsichtigen Interpretation zugänglich war, ausschließlich eine einzige Bindungsstellenart nachweisbar ist. Auch die Werte der Dissoziationskonstanten [$K_D = 2.7 \times 10^{-9} \text{ M}$ (Woolf) bzw. $2.6 \times 10^{-9} \text{ M}$ (Scatchard)] und der maximalen Bindungskapazitäten [$B_{\text{max}} = 6.4 \text{ pmole/2ml}$ (Woolf) bzw. 6.3 pmole/2ml (Scatchard)] stimmen aus beiden Verfahren annähernd überein.

Die Auftragung nach Hill bestätigt die bereits erhobenen Befunde und gibt darüber hinaus keinen Anhalt für negative oder positive Kooperativität oder Heterogenität der Glykosidbindungsstellen, da sowohl der Graph mit einem Korrelationskoeffizienten $R = 0.99$ linear verläuft als auch der Hill-Koeffizient, $N_H = 1.1$, im Rahmen des messtechnisch Möglichen nahezu bei einem Wert von 1 liegt.

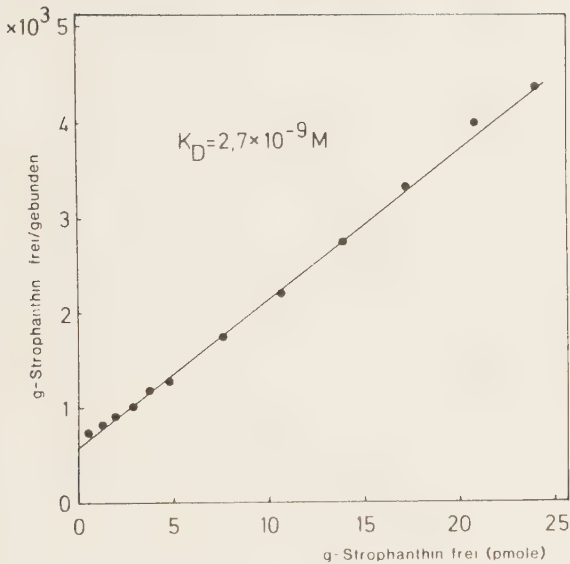


Abbildung 8:

Konzentrationsabhängige Bindung von (3H)-g-Strophanthin an isolierte Zellmembranen des linken Ventrikelmyokards des Schafherzens - Auftragung nach Woolf

Die Bindungsdaten aus Abbildung 7 an isolierten Zellmembranen des Schafmyokards wurden nach der Methodik von Woolf (Ligandenkonz. frei/gebunden/Ligandenkonz. frei) aufgetragen.

$$K_D = 2.7 \times 10^{-9} M$$

$$B_{\max} = 6.38 \text{ pmole/2ml}$$

Für Versuchsbedingungen vergleiche Abbildung 7.

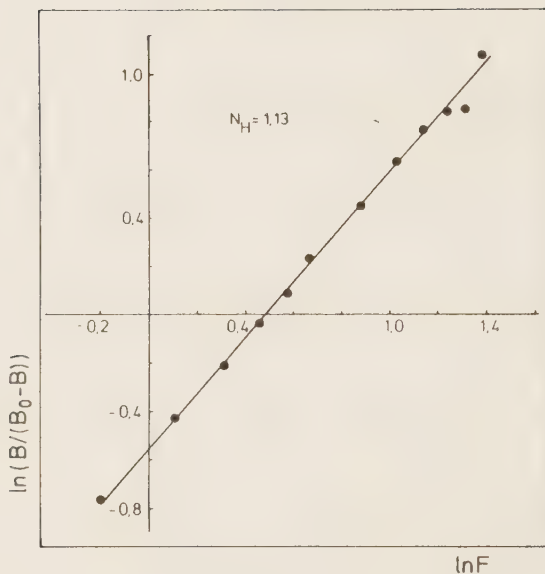


Abbildung 9:

Konzentrationsabhängige Bindung von (^3H) -g-Strophanthin an isolierte Zellmembranen des linken Ventrikelmuskels des Schafherzens - Auftragung nach Hill

Die Bindungsdaten an isolierten Zellmembranen des Schafmyokards aus Abbildung 7 (nach Scatchard) und 8 (nach Woolf) wurden nach der Methodik von Hill aufgetragen.
($\ln$ Ligandenkonz. gebunden/frei/ $\ln$ Ligandenkonz. frei)

Korrelationskoeffizient $R > 0.99$

$B_0 = 5.9 \text{ pmole/2ml}$

Für Versuchsbedingungen vergleiche Abbildung 7.

3.1.7. Dissoziations- und kinetische Konstanten

- Einfluß eines Mg^{2+} , ATP und Na^+ -haltigen Mediums

Die Glykosidbindung kann durch Änderung verschiedener Umgebungsparameter - z. B. Temperatur, pH oder Ionenzusammensetzung des Inkubationsmediums - beeinflusst werden:

Studien zur pH-Abhängigkeit an Rinderhirnpräparationen ergaben eine optimale Bindungsaffinität bei pH 7.3, die sich zwischen pH-Werten von ca. 5.5 - 7.4 nur geringfügig änderte, während gleichzeitig die $(Na^+ + K^+)$ -ATPase-Aktivität in demselben Bereich starken Schwankungen unterworfen war (66).

Für zahlreiche einzelne Ionen (z. B. Magnesium, Mangan, Sulfat, Calcium) oder Kombinationen - auch mit Nucleotiden - (z. B. $Mg^{2+} + ATP$, $Mg^{2+} + SO_4$, $Mg^{2+} + As$) wurde ein affinitätssteigernder Effekt nachgewiesen (66, 218).

Aus diesen Untersuchungen resultierte die Hypothese, daß der g-Strophanthin-Rezeptor in mindestens zwei Konformationszuständen (R_α und R_β) unterschiedlicher Affinität existiert und es auch von der Ionenzusammensetzung abhängt, in welchem Gleichgewicht sich diese Zustände befinden (66).

Nur unter zwei Bedingungen scheinen alle Rezeptoren in den hochaffinen Zustand überführbar zu sein: bei der gleichzeitigen Anwesenheit von entweder Mg^{2+} , ATP und Na^+ (11, 66, 218) oder Mg^{2+} und anorganischem Phosphat, P_i (10).

Wir bestimmten unter sonst identischen Bedingungen bei 37 °C die Dissoziationskonstante, K_D , und die Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten in Anwesenheit von 3mM $MgCl$, 3mM ATP und 150 mM $NaCl$ (Tabelle 3):

Die Dissoziationskonstante, K_D , lag mit $3.3 \times 10^{-9} M$ (gegenüber $1.9 \times 10^{-9} M$, $Mg^{2+} + P_i$) zwar etwas höher, jedoch noch immer im gleichen Konzentrationsbereich und korrespondierte so gut mit den kürzlich erhobenen Befunden an Rinder- und Meerschweinchenzellmembranen, die für eine Mg^{2+} -ATP- Na^+ -unterstützte (3H)-g-Strophanthin-Bindung ebenfalls im Vergleich eine etwas geringere Affinität aufwiesen (35). In Konsequenz der verringerten Bindungsaffinität war auch die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante, k_{+1} , erniedrigt [$9.2 \pm 0.9 \times 10^4 M^{-1} sec^{-1}$ gegenüber $1.2 \pm 0.1 \times 10^5 M^{-1} sec^{-1}$ ($Mg^{2+} + P_i$)], bei einer nur geringfügig erhöhten Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten, k_{-1} , [$1.6 \pm 0.1 \times 10^{-4} sec^{-1}$ gegenüber $1.3 \pm 0.1 \times 10^{-4} (Mg^{2+} + P_i)$] {vgl. Tabelle 3}.

3.1.8. Thermodynamik der g-Strophanthin-Bindungsreaktion
- Bestimmung von Gleichgewichtszustand und Übergangsphase

Mit Hilfe der Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten, K_D , und der kinetischen Konstanten, k_{+1} und k_{-1} , ließ sich die (3H)-g-Strophanthin-Bindung an isolierte Schafherzzellmembranen als zeitabhängig, sättigbar, reversibel, spezifisch und mit hoher Affinität beschreiben. Darüberhinaus ermöglichten nun die Untersuchungen über den Einfluß der Temperatur auf diese Konstanten eine Aufschlüsselung der energetischen Verhältnisse der Pharmakon-Rezeptor-Interaktion, die sich durch die Parameter Freie Energie, Enthalpie und Entropie charakterisieren lassen.

Diese Begriffe lassen sich sowohl für die Thermodynamik des Gleichgewichtszustandes als auch der Übergangsphase der Reaktion folgendermaßen definieren (64, 76, 252, 258):

A: Thermodynamik des Gleichgewichtszustandes

Die Gibb's Freie Energie, G , wird aus Enthalpie, H , und der Entropie, S , wie folgt berechnet:

$$G = H - TS \quad (\text{kcal mol}^{-1}) \quad \text{Gleichung 1}$$

T = absolute Temperatur (K)

Für eine Reaktion, die bei konstanter Temperatur und konstantem Druck abläuft, ergibt sich die Änderung der Freien Energie aus den Differenzen von Enthalpie- und Entropie-Werten zwischen Reaktanten und Produkten:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (\text{kcal mol}^{-1}) \quad \text{Gleichung 2}$$

Die Änderung der Enthalpie entspricht der Wärme, die während der Reaktion abgegeben ($\Delta H^\circ < 0$) oder aufgenommen ($\Delta H^\circ > 0$) wird und reflektiert die Beteiligung intermolekularer Kräfte, wie Dipol-Interaktionen und Wasserstoffbrückenbindungen.

Die Änderung der Entropie gibt die Differenz in der Anzahl von äquivalenten Energieniveaus wieder und kann als Änderung in dem Grad der "Ordnung" des Systems verstanden werden.

Die Änderung der Freien Energie im Verlaufe der Assoziation steht zur Affinitätskonstanten, $K_A = 1/K_D$, in der Beziehung:

$$\Delta G^\circ = - RT \ln K_A \text{ (kcal mol}^{-1}\text{)} \quad \text{Gleichung 3}$$

R = Gaskonstante, $1.986 \text{ (cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}\text{)}$

T = absolute Temperatur (K)

Dies bedeutet: je höher die Affinität einer Reaktion, um so negativer wird die Änderung der Freien Energie.

Gleichung 2 macht ersichtlich, daß die treibenden Kräfte einer Reaktion mit hoher Affinität ($\Delta G^\circ < 0$) entweder aus einer negativen Änderung der Enthalpie ($\Delta H^\circ < 0$) oder einem positiven Wechsel der Entropie ($\Delta S^\circ > 0$) resultieren können.

Die Änderung der Enthalpie kann aus der Temperaturabhängigkeit der Affinitätskonstanten, K_A , bestimmt werden: In der Auftragung nach van't Hoff ($\ln K_A / 1/T$) ergibt sich die Steigung des Graphen als $-H^\circ / R$.

Nach Bestimmung der Freien Energie aus Gleichung 3 erhält man die Entropie aus Gleichung 2.

B: Thermodynamik der Übergangsphase

Ähnliche Berechnungen gelten für die Übergangsphase, deren Energie-Barriere überwunden werden muß, damit eine Reaktion stattfinden kann.

Die Änderung der Freien Energie der Übergangszone ($\Delta G^\ddagger$) folgt der Gleichung

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \text{ (kcal mol}^{-1}\text{)} \quad \text{Gleichung 4}$$

Zwischen $\Delta G^\ddagger$ und der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten, k_{+1} , besteht der Zusammenhang:

$$\Delta G^+ = - RT \ln k_{+1} + RT \ln (k \times T/h) \quad \text{Gleichung 5}$$

R = Gaskonstante, 1.986 (cal mol⁻¹K⁻¹)

T = absolute Temperatur (K)

k = Boltzmann'sche Konstante, 1.380662 x 10⁻²³ (J K⁻¹)

h = Planck'sche Konstante, 6.626 x 10⁻³⁴ (J s)

Die Aktivierungsenergie, E_A, kann aus dem empirischen Verhältnis von k₊₁ und der Temperatur ermittelt werden: Bei der Auftragung nach Arrhenius (ln k₊₁ / 1/T) erhält man die Steigung als -E_A/R. Ist die Aktivierungsenergie einmal bekannt, kann die Enthalpie berechnet werden:

$$\Delta H^+ = E_A - RT \quad (\text{kcal mol}^{-1}) \quad \text{Gleichung 6}$$

ΔG⁺ ergibt sich aus Gleichung 5 und ΔS⁺ aus Gleichung 4.

Mittels einer exakten Analyse von Kinetik und Gleichgewichtskonstanten einer Reaktion läßt sich demnach nicht nur die qualitative Frage beantworten, ob ein Prozeß exergon oder energon abläuft, sondern es lassen sich auch quantitative Aussagen über die energetischen Zusammenhänge (Wärmeabgabe oder -aufnahme, Arbeitsleistung der Reaktion u. a.) treffen. Eine erste Auswertung der Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit der Glykosidbindung zeigte bereits die Veränderung der kinetischen Konstanten an: Verlangsamung sowohl der Rate der Assoziation als auch der Dissoziation bei Erniedrigung der Temperatur.

Die halblogarithmische Auftragung der Konstanten in Abhängigkeit von dem inversen Wert der absoluten Temperatur (Auftragung nach Arrhenius, Abbildung 10 A) verdeutlicht diese Änderung der Umsatzraten, die offensichtlich die Änderung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten, k₋₁, in stärkerem Ausmaß betrifft (erkennbar auch an der größeren Steilheit der Geraden) als die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante, k₊₁. Demzufolge muß sich auch das Verhältnis der beiden Konstanten mit Änderung der Temperatur ändern. Dies drückt sich einerseits rechnerisch in der Erniedrigung der Dissoziationskon-

stanten, K_D , mit abnehmender Temperatur aus (vgl. Tabelle 3), andererseits graphisch darin, daß in der Auftragung nach van't Hoff (Abbildung 10 B) die Verbindungsgerade der einzelnen Affinitätskonstanten, $K_A = 1/K_D = k_{+1}/k_{-1}$, keine Parallele zur x-Achse beschreibt, sondern eine Steigung besitzt, aus der sich die Änderung der Enthalpie, ΔH° , errechnen läßt.

In der Auftragung nach Arrhenius ist bemerkenswert, daß der bei 10° C ermittelte Wert der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten nicht auf der Verbindungsgeraden der übrigen Wertepunkte liegt. Dies führt in der Auftragung nach van't Hoff ebenfalls zu einer Abweichung des Ergebnisses bei 10° C. Verbindet man den abweichenden Wert mit den übrigen Punkten, so ergibt sich ein "Knick" in der Temperaturabhängigkeit bei ca. 20° C. Auf Grund der interessanten Problematik, die dieses Ergebniss aufzeigt, wird es später noch detaillierter diskutiert werden.

Damit sich die Substrat-Rezeptor-Interaktion ereignen kann, benötigt das System - auch wenn es sich letztlich um einen exergonen Prozeß handeln sollte - anfänglich Energie, um die "Barriere", mit der sich ein System der Veränderung seines status quo entgegenstellt, zu überwinden.

Bei den Versuchen der (^3H)-g-Strophanthin-Bindung an isolierte Zellmembranen des Schafherzens mußte eine Aktivierungsenergie, E_A , von $18.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ zugeführt werden, die sich bei 37° C in einer Erhöhung der Freien Energie ($\Delta G^+ = 11.0 \text{ kcal mol}^{-1}$), der Enthalpie ($\Delta H^+ = 18.3 \text{ kcal mol}^{-1}$) und einer starken Zunahme der Entropie des Systems ($\Delta S^+ = 23.7 \text{ cal mol}^{-1} \text{ deg}^{-1}$) äußerte (vgl. Tabelle 5 und Abbildung 11).

Ist die Bindungsreaktion abgelaufen und hat sich das System auf ein neues Gleichgewicht eingestellt, so zeigen nun die thermodynamischen Variablen den eigentlichen Charakter der Reaktion an: Bei der Bindung von (^3H)-g-Strophanthin an die Bindungsstelle ging Freie Energie ($\Delta G^\circ = -12.7 \text{ kcal mol}^{-1}$, 37° C) verloren, die bei maximaler Ausnutzung als Arbeitsenergie genutzt werden könnte. Ein noch größerer Beitrag wurde als Wärme abgegeben ($\Delta H^\circ = -15.7 \text{ kcal mol}^{-1}$) - und da der einem System innewohnenden Energie auch ein Ordnungsgrad entspricht, ging der Verlust an Energie in diesem exergonen

Prozeß auch mit einer Erniedrigung der Entropie einher ($\Delta S^\circ = -9.7 \text{ cal mol}^{-1} \text{ deg}^{-1}$).

Abbildung 11 veranschaulicht noch einmal die energetischen Verhältnisse.

Tabelle 6 stellt diese Ergebnisse den unter gleichen Bedingungen erhobenen Beobachtungen an anderen Spezies gegenüber. Dabei wird wiederum die Ähnlichkeit der g-Strophanthin-Bindung an isolierte Zellmembranen des Herzens zwischen den Arten Schaf und Mensch deutlich.

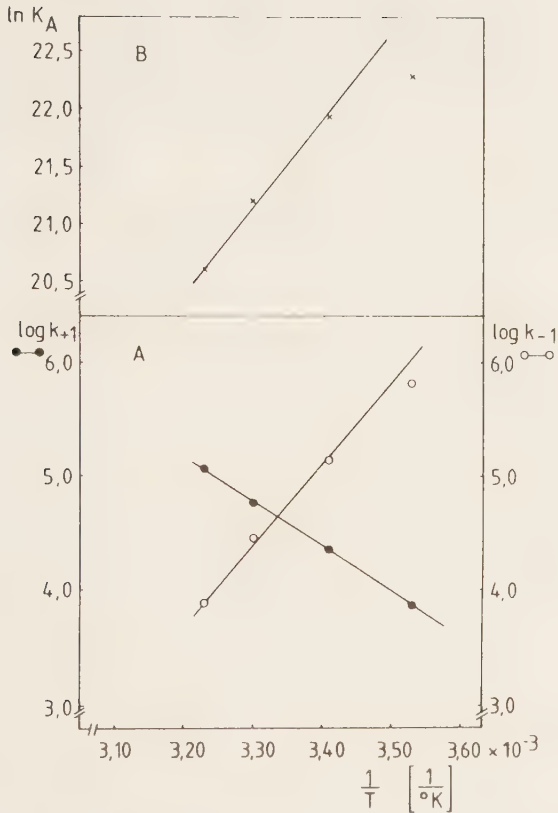


Abbildung 10

Auftragung der temperaturabhängigen Assoziations- bzw. Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten nach Arrhenius (A) und van't Hoff (B).

A: Der Logarithmus der Assoziations- bzw. Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten ($\log k_{+1}$, $\bullet-\bullet$, bzw. $\log k_{-1}$, $\circ-\circ$) wurde in Abhängigkeit der inversen, absoluten Temperatur ($1/T$) aufgetragen. Die Werte der Geschwindigkeitskonstanten wurden den Versuchen zur temperatur- und zeitabhängigen (^3H)-g-Strophanthin-Assoziation bzw. -Dissoziation an isolierten Zellmembranen des linken Schafherzventrikels entnommen (vgl. Abbildung 6 und Tabelle 3).

B: Der natürliche Logarithmus der Affinitätskonstanten, $\ln K_A$, wurde in Abhängigkeit der inversen, absoluten Temperatur ($1/T$) aufgetragen (Methode nach van't Hoff).

Die Affinitätskonstante, K_A , ergibt sich als $K_A = 1/K_D = k_+/k_-$, wobei die Werte der Geschwindigkeitskonstanten ebenfalls den zeitabhängigen Bindungsversuchen (Abbildung 6 und Tabelle 3) entnommen wurden.

Aus der Steigung der Geraden läßt sich die Enthalpie-Änderung (ΔH°) ermitteln.

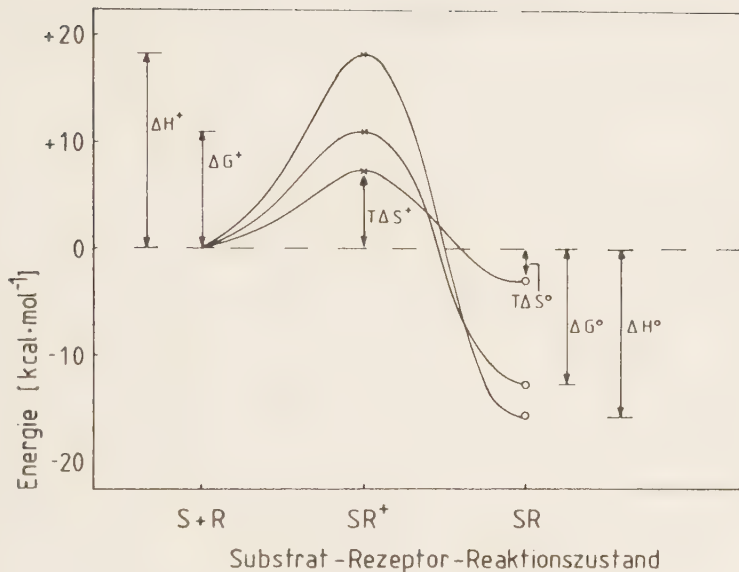


Abbildung 11:

Energiediagramm der Bindungsreaktion von (³H)-g-Strophanthin an isolierte Zellmembranen des linken Schafventrikels bei 37° C.

Die Änderung der Thermodynamischen Parameter (kcal mol⁻¹): Freie Energie (ΔG), Enthalpie (ΔH) und Entropie (ΔS), hier als (TΔS), wurde in Abhängigkeit des Zustandes der Reaktion aufgetragen. [T = absolute Temperatur, K° (siehe Tabelle 5)].

Die Reaktionszustände sind:

S ‡ R = Ausgangssituation

SR⁺ = Übergangsphase (Δ⁺)

SR = Gleichgewichtszustand (Δ°) nach Ablauf der Reaktion

Tabelle 5:

Thermodynamische Parameter der (^3H)-g-Strophanthin-Bindungs-Reaktion an isolierten Zellmembranen des Schafherzens.

A: Übergangsphase

Temperatur (° C)	10°	20°	30°	37°
Freie Energie, ΔG^+ (kcal x mol $^{-1}$)	11.5	11.3	11.2	11.0
Enthalpie, ΔH^+ (kcal x mol $^{-1}$)	18.4	18.4	18.3	18.3
Entropie, ΔS^+ (cal/mol x deg $^{-1}$)	24.1	24.1	23.7	23.6

B: Gleichgewichtszustand

Freie Energie, ΔG° (kcal x mol $^{-1}$)	- 12.5	- 12.8	- 12.8	- 12.7
Enthalpie, ΔH°^* (kcal x mol $^{-1}$)	- 15.7	- 15.7	- 15.7	- 15.7
Entropie, ΔS° (cal/mol x deg $^{-1}$)	- 11.2	- 10.0	- 9.7	- 9.7

* unter Standardbedingungen

Tabelle 6:

Vergleich der thermodynamischen Parameter der (^3H)-g-Strophanthin-Bindung an isolierte Zellmembranen verschiedener Spezies (37° C).

Spezies	Freie Energie, ΔG° (kcal x mol $^{-1}$)	Enthalpie, ΔH° (kcal x mol $^{-1}$)	Entropie, ΔS° cal/mol x deg $^{-1}$)
Schafherz	- 12.7	- 15.7	- 9.7
Menschenherz *	- 12.5	- 13.7	- 2.8
Rinderherz **	- 11	- 4	+ 24
Meerschweinchenherz ***	- 9.87	- 4.79	+ 16.37

* aus: E. Erdmann und W. Schoner, 1973a (64)

** aus: P. Presek, 1982 (196)

*** aus: G. Wagner, 1985 (251)

3.1.9. Effekt der (^3H)-g-Strophanthin-Bindung auf die ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität

Die bisherigen Untersuchungen der (^3H)-g-Strophanthin-Bindung an isolierte Zellmembranen des Schafherzens ermöglichten es, von einer spezifischen Glykosidbindungsstelle zu sprechen, das Bindungsverhalten zu charakterisieren und die energetischen Verhältnisse der Bindungsreaktion aufzuschlüsseln.

Um eine spezifische Bindungsstelle jedoch als "Rezeptor" definieren zu können, gilt als Voraussetzung der Nachweis einer biologischen Wirkung, die als Antwort auf die Bindungsreaktion angesehen werden kann.

Seitdem Schatzmann 1953 (216) am Erythrozyten ein durch Herzglykoside spezifisch hemmbares ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-Transportsystem beschrieben hatte, wurden intensive Bemühungen unternommen, die zwar in der überwiegenden Zahl Evidenz für eine Korrelation des Glykosideffektes mit der Hemmung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase - als "biologischer Wirkung" - in Herzmuskelgewebe erbringen konnten, jedoch auch von gegenteiligen Ergebnissen berichteten (vgl. Diskussion 4.3.).

So konnten Erdmann et al. in zahlreichen Studien an Zellmembranen (64, 67, 68, 80) eine enge Korrelation der Glykosidbindungsbesetzung mit der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Hemmung für die glykosidempfindlichen Spezies Mensch, Rind, Hund und Katze aufzeigen, während eine Dissoziation dieser Parameter in den relativ Digitalis-unempfindlichen Tierarten Meerschweinchen und Ratte nachweisbar war (35, 75).

Ein direkter Vergleich der g-Strophanthin-Bindung und der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Hemmung ist nur möglich, wenn die Experimente unter Äquilibriumbedingungen mit identischen Rezeptorkonzentrationen durchgeführt werden (67).

Deshalb wurden die (^3H)-g-Strophanthin-Bindung und Hemmung der ATPase-Aktivität isolierter Zellmembranen des Schafherzens aus ein und demselben Ansatz ermittelt.

Analog den Studien zur konzentrationsabhängigen Bindung wurden Zellmembranpräparationen bei 37°C und einem reduzierten Gesamtvolumen von 1 ml in Mg^{2+} - P_i -haltiger Lösung mit (^3H)-g-Strophanthin und ansteigenden g-Strophanthin-Konzentrationen

inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit (5 h) wurde ein Teil des Ansatzes (300 μ l) zur Bestimmung der konzentrationsabhängigen Bindung rasch abfiltriert und mit einem anderen Teil (600 μ l) die konzentrationsabhängige ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität in dem gekoppelten, optisch-kinetischen Test gemessen. Um auch für die Zeitdauer der ATPase-Aktivitätsmessung Äquilibrierungsbedingungen aufrechtzuerhalten, enthielt die Testlösung die jeweils gleiche, molare g-Strophanthin-Konzentration.

Abbildung 12 zeigt die Korrelation von konzentrationsabhängiger (^3H)-g-Strophanthin-Bindung und spezifischer ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivitätshemmung durch g-Strophanthin an Zellmembranen des Schafherzens:

Die beiden Parameter stimmen nicht nur in der g-Strophanthin-Konzentration überein, die benötigt wurde ($3 \times 10^{-9}\text{M}$), um einerseits 50 % der Bindungsstellen zu besetzen und andererseits die spezifische ATPase-Aktivität auf 50 % zu reduzieren, vielmehr kann eine enge Korrelation ausnahmslos über den gesamten, untersuchten g-Strophanthin-Konzentrationsbereich nachgewiesen werden.

Auf Grund dieser Ergebnisse ist es nunmehr erlaubt, von der Glykosidbindungsstelle in Zellmembranen des Schafherzens als einem spezifischen "Rezeptor" zu sprechen.

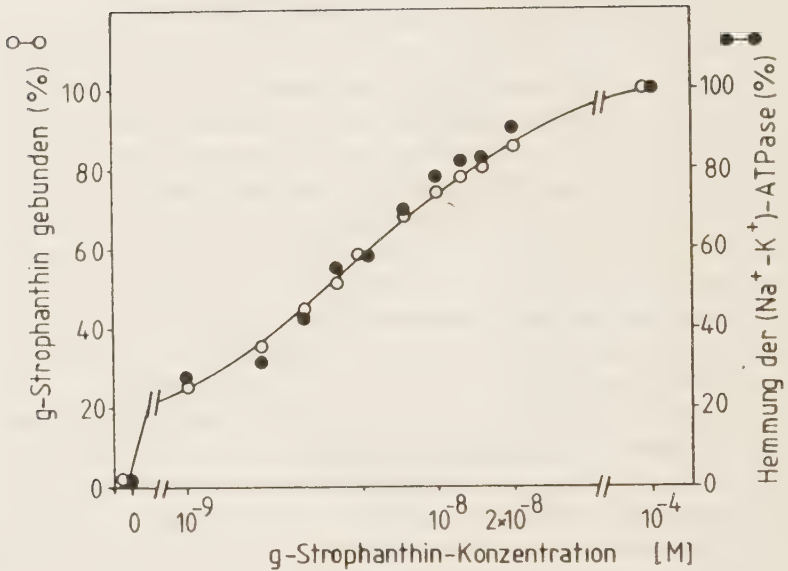


Abbildung 12:

Konzentrationsabhängige (³H)-g-Strophanthin-Bindung (o-o) und Hemmung der glykosidspezifischen (Na⁺+K⁺)-ATPase (●-●) an isolierten Zellmembranen des linken Schafherzventrikels

Isoletzte Zellmembranen [0.35 mg Membranprotein/Ansatz, (Na⁺+K⁺)-ATPase-Aktivität 0.25 U/mg Protein, ca. 87 % spezifische Aktivität] wurden bei 37° C für 5 h in 3mM MgCl₂, 3mM Imidazol/PO₄, 50mM Imidazol/HCl, pH 7.25, 1 x 10⁻⁹ M (³H)-g-Strophanthin und ansteigenden Konzentrationen (1 x 10⁻⁹ bis 2 x 10⁻⁸ M) g-Strophanthin inkubiert. Gesamtvolumen 1 ml. Nach Ablauf der Inkubationszeit, die den Versuchen zur zeitabhängigen Bindung entnommen wurde, wurde sowohl mit 300 µl des Ansatzes die proteingebundene Radioaktivität durch rasche Filtration (Glasfaserfilter) ermittelt, als auch mit 600 µl desselben Ansatzes die spezifische (Na⁺+K⁺)-ATPase-Aktivität im gekoppelten, optisch-kinetischen Test (37° C) bestimmt, in dessen Testlösung vorher die identische g-Strophanthin-Konzentration hergestellt worden war. Die unspezifische (³H)-g-Strophanthin-Bindung (0.05 %) bzw. unspezifische (Na⁺+K⁺)-ATPase-Aktivität (13 %) wurde in der Anwesenheit von 1 x 10⁻³ M g-Strophanthin bestimmt und von der Gesamtbindung bzw. -Aktivität subtrahiert.

3.2. (^3H)-g-Strophanthin-Bindung an Homogenate aus Purkinjefasern und aus Arbeitsmyokard

3.2.1. Gleichgewichtskonstanten, kinetische Konstanten und Anzahl der Bindungsstellen

Die bisherigen Bindungsstudien erfolgten an gereinigten, angereicherten Zellmembranen. Dieses Präparationsverfahren besitzt einige wichtige Vorteile gegenüber einfachen Homogenaten:

Die Aufschließung des Zellverbandes und der einzelnen Zelle erlaubt einerseits die selektive Anreicherung von Zellmembranen (nachgeprüft in elektronenmikroskopischen Aufnahmen, vgl. Schoner et al., 217) und andererseits die Entfernung intrazellulärer Bestandteile, die das Bindungsverhalten von g-Strophanthin an Zellmembranen beeinflussen oder selber g-Strophanthin binden könnten. Durch dieses Verfahren werden ferner die Ionenverhältnisse "bereinigt". So werden zum Beispiel das in der Zelle vorhandene Kalium und Calcium durch Öffnen der Zelle in Lösung gebracht und können mit dieser entfernt werden, sodaß eine spätere g-Strophanthin-Bindung nur unter den bewußt gewählten Ionenzusammensetzungen des Inkubationsmediums erfolgt.

Außerdem werden die unspezifischen, überwiegend durch Mg^{2+} aktivierbaren ATPasen, die neben den glykosidspezifischen, $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbaren ATPasen in der Zellmembran inkorporiert sind, teilweise inaktiviert [vorwiegend durch die Verwendung des Detergens Desoxycholat (0.5 %)].

Diese Vorteile schlagen sich nieder in:

1. einem geringen Anteil unspezifischer Bindung
2. einer relativ hohen Ausbeute an glykosidspezifisch hemmbarer $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität.

Die Nachteile dieses Verfahrens bestehen überwiegend in den Problemen, die mit jedem präparativen Eingriff in ein intaktes System verbunden sind:

Die Maßnahmen, mit denen versucht wird zelluläre Einflüsse auf die Glykosidbindung zu eliminieren, können selber sowohl die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität als auch das Bindungsverhalten beeinflussen.

Da durch das Präparationsverfahren nur ein unberechenbarer Bruchteil des Ausgangsmaterials Verwendung findet, - der übrige Teil wird verworfen - ist es nicht möglich, die Anzahl der Bindungsstellen auf das Ausgangsgewicht zu beziehen (Die Umrechnung auf mg Protein ist prinzipiell möglich, aber in unserem Falle unzweckmäßig). Somit wäre ein wichtiger Vergleichspunkt der Ergebnisse aus den in vitro -Bindungsstudien mit den Resultaten an schlagenden Geweben entfallen.

Aus diesen Gründen wurde aus Gewebe (0.3 - 1.5 g Feuchtgewicht) des linken Ventrikels, des rechten Ventrikels, des Moderatorbandes und von Purkinjefasern des Schafherzens durch einfaches Homogenisieren (= Aufschließen des Zellverbandes), Zentrifugieren (= Entfernen von intrazellulären Bestandteilen, von wasserlöslichen, nicht ATPase-haltigen Proteinen und von Elektrolyten) und durch Versetzen des Sedimentes mit Pufferlösung (pH 7.25) Zellhomogenate hergestellt. Hiermit war zum ersten Mal in dieser Arbeit ein Vergleich des Reizleitungssystems mit dem Myokard möglich.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in den Abbildungen 13 - 19 und Tabelle 7 zusammengefaßt.

Erwartungsgemäß kann einerseits eine geringere ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität in diesen Homogenaten (ca. 12 nmol ATP hydrolysiert/min/mg Protein; linker Ventrikel) gemessen werden als in angereicherten Zellmembranen (ca. 250 nmol ATP hydrolysiert/min/mg Protein), andererseits liegt auch der relative Anteil der glykosidspezifisch hemmbaren ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase an den gesamten meßbaren ATPasen unter dem in Zellmembranpräparationen (5 - 30 % in Homogenaten gegenüber 70 - 95 % in Zellmembranpräparationen des linken Ventrikels).

Trotzdem erfolgte die (^3H)-g-Strophanthin-Bindung mit einer hohen Spezifität ($> 99.9\%$).

Die konzentrationsabhängigen Bindungsstudien (Temperatur 37°C , Inkubationszeit 5 h, Bindung Mg^{2+} - und P_i -unterstützt) zeigen in der Auftragung nach Scatchard, daß in allen 4 untersuchten Gewebekomogenaten (^3H)-g-Strophanthin spezifisch an eine einzige Rezeptorart (erkennbar an dem linearen Verlauf der Bindungsgraphen, vgl. Abbildung 13 - 16) bindet. Die Dissoziationskonstante, K_D , liegt in allen Homogenaten im

gleichen Konzentrationsbereich. Übereinstimmende Ergebnisse zeigen auch die Analysen dieser Bindungsdaten mit Hilfe der Methoden von Woolf und Hill, die ebenfalls bei keinem der Homogenate mehr als 1 Bindungsstellenart oder negative bzw. positive Kooperativität ergaben.

Die Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten sind ebenfalls für alle Homogenatarten nahezu identisch (Abbildung 17 - 19). Vergleicht man die Bindungsreaktionskonstanten des linken Ventrikelgewebes der zwei verschiedenen Präparationsarten, so fällt die nahezu um den Faktor 2 höhere Affinität des Myokards in Zellmembranpräparationen auf ($K_D = 3.6 \times 10^{-9} M$ gegenüber $1.9 \times 10^{-9} M$ in Membranpräparationen).

Da von den Geschwindigkeitskonstanten nur die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante [$k_{+1} = 7.3 \times 10^4$ bzw. $1.2 \times 10^5 M^{-1} sec^{-1}$ (Membranpräparation)] erniedrigt ist, liegt der Verdacht nahe, daß es sich um einen Effekt von Kalium handelt, das eventuell noch in Resten in den Homogenaten vorhanden war. Das folgende Kapitel wird zeigen, daß Kalium auf die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante eine erniedrigende Wirkung ausübt.

Die Anzahl der g-Strophanthin-Bindungsstellen pro Gramm Feuchtgewicht, die für Myokardhomogenate der Schafherzventrikel aus der Auftragung nach Scatchard ermittelt wurden (linker Ventrikel 1.3×10^{14} , rechter Ventrikel 0.86×10^{14} , Moderatorband 1.1×10^{14}) ist ähnlich der, die in Homogenaten aus menschlichem Herzgewebe nachgewiesen werden konnte (linker Ventrikel 1.5×10^{14} , rechter Ventrikel 0.9×10^{14} ; Erdmann et al., 80).

Im Gegensatz hierzu steht jedoch die wesentlich geringere Bindungsstellenzahl für Homogenate aus Purkinjefasern des Schafherzens mit nur 0.33×10^{14} Bindungsstellen/g Feuchtgewicht. Dies korreliert mit der in Purkinjefasern geringeren spezifischen ($Na^+ + K^+$)-ATPase-Aktivität von 2.5 nmol gegenüber 12 nmol ATP hydrolysiert/min/mg Protein im linken Ventrikel. Aus dieser Versuchsreihe bleibt festzuhalten, daß die Bindung von (3H)-g-Strophanthin an Zellhomogenate aus Reizleitungssystem und Arbeitsmyokard des Schafherzens in einem qualitativ

übereinstimmenden Verhalten erfolgt, sich jedoch Unterschiede in der Quantität dergestalt aufzeigen ließen, daß die Purkinjefasern weniger Glykosidbindungsstellen als das Myokard besitzen.

Tabelle 7:

Gleichgewichts- und Kinetische Konstanten, Enzymaktivität und Bindungskapazität in verschiedenen Gewebekomponenten des Schafherzens (37 °C)

Membranpräparation	linker Ventrikel	rechter Ventrikel	Moderatorband	Purkinjefaser
k_{+1} ($M^{-1} \text{sec}^{-1}$)	$7.3 \pm 0.8 \times 10^4$ (n=4)	-	$8.2 \pm 0.5 \times 10^4$ (n=3)	$7.9 \pm 0.2 \times 10^4$ (n=12)
k_{-1} (sec^{-1})	$1.3 \pm 0.3 \times 10^{-4}$ (n=4)	-	$1.1 \pm 0.4 \times 10^{-4}$ (n=3)	$1.0 \pm 0.05 \times 10^{-4}$ (n=12)
$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}}$ (M)	1.8×10^{-9}	-	1.3×10^{-9}	1.3×10^{-9}
K_D (Scatchard) (M)	$3.6 \pm 0.4 \times 10^{-9}$ (n=5)	$2.4 \pm 0.2 \times 10^{-9}$ (n=8)	$2.1 \pm 0.4 \times 10^{-9}$ (n=3)	$1.9 \pm 0.2 \times 10^{-9}$ (n=12)
$(Na^+ + K^+)$ -ATPase Aktivität xx	12 ± 3	10 ± 5	21 ± 10	2.5 ± 0.4
Bindungsstellen / g Feuchtgewicht	$1.3 \pm 0.1 \times 10^{14}$ (n=5)	$0.86 \pm 0.07 \times 10^{14}$ (n=8)	$1.1 \pm 0.2 \times 10^{14}$ (n=3)	$0.33 \pm 0.1 \times 10^{14}$ (n=3)
k_{+1} = Assoziationsgeschwindigkeitskonstante, $\bar{x} \pm \text{sem}$				xx = (nmol ATP hydrolysiert/min/mg Protein)
k_{-1} = Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante, $\bar{x} \pm \text{sem}$				
K_D = Dissoziationskonstante, $\bar{x} \pm \text{sem}$				

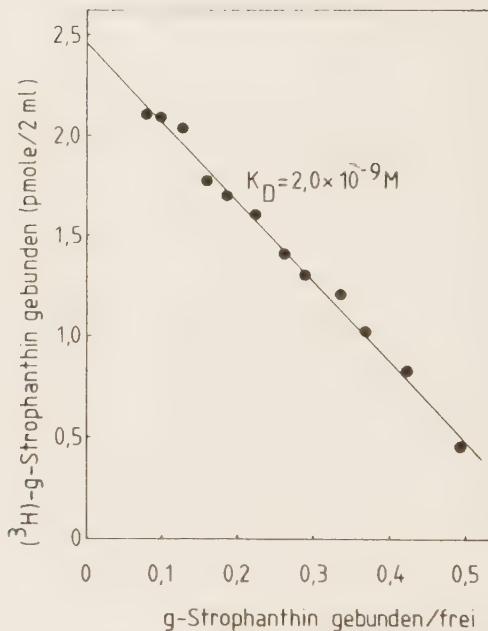


Abbildung 13:

Konzentrationsabhängige (^3H)-g-Strophanthin-Bindung an Gewebeshomogenate aus linkem Schafherzventrikel

Homogenate aus linkem Ventrikelmyokard (1.5 g Feuchtgewicht, 0.54 mg Membranprotein/Ansatz, 0.02 U/mg Protein ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität, ca. 22 % spezifische Aktivität) wurden bei 37°C 5 h lang in 3mM MgCl_2 , 3mM Imidazol/ PO_4 , 50mM Imidazol/HCl, pH 7.25, $1 \times 10^{-9} \text{M}$ (^3H)-g-Strophanthin und ansteigenden Konzentrationen ($0 - 1.5 \times 10^{-8} \text{M}$) g-Strophanthin inkubiert. Gesamtvolumen 2 ml. Die Inkubationszeit wurde den Versuchen zur zeitabhängigen Bindung (siehe Abbildung 5) entnommen. Unspezifische (^3H)-g-Strophanthin-Bindung in Anwesenheit von $1 \times 10^{-4} \text{M}$ Strophanthin $< 0.002 \%$.

Bestimmung der proteingebundenen Radioaktivität durch rasche Filtration (Glasfaserfilter).

Die (^3H)-g-Strophanthin-Bindungsdaten wurden nach der Methode von Scatchard aufgetragen und die Dissoziationskonstante, K_D , aus der negativen Steigung der Geraden ermittelt. Korrelationskoeffizient der Verbindungsgeraden $R = 0.99$.

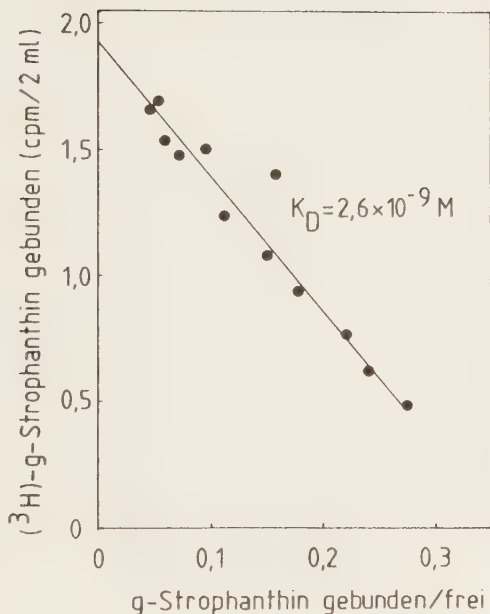


Abbildung 14:

Konzentrationsabhängige (³H)-g-Strophanthin-Bindung an Gewebekomogenate aus rechtem Schafherzventrikel

Homogenat aus rechtem Ventrikelmyokard (0.73 g Feuchtgewicht in 10 ml Pufferlösung [(1mM EDTA, pH 7.25), 0.11 mg Protein/Ansatz, (Na⁺+K⁺)-ATPase-Aktivität, 0.009 U/mg Protein (ca. 11 % spezifische Aktivität)] wurden bei 37° C 5 h lang in 3mM MgCl₂, 3mM Imidazol/PO₄, 50mM Imidazol/HCl, pH 7.25, 1 x 10⁻⁹M (³H)₂-g-Strophanthin und ansteigenden Konzentrationen (0 - 1.5⁻⁸M) g-Strophanthin inkubiert. Gesamtvolumen 2 ml. Die Inkubationszeit wurde den Versuchen zur zeitabhängigen Bindung (siehe Abbildung 5) entnommen. Bestimmung der proteingebundenen Radioaktivität durch rasche Filtration (Glasfaserfilter). Unspezifische (³H)-g-Strophanthin-Bindung in Anwesenheit von 1 x 10⁻⁴M g-Strophanthin 0.03 %). Die (³H)-g-Strophanthin-Bindungsdaten wurden nach der Methode von Scatchard aufgetragen und die Dissoziationskonstante, K_D, aus der negativen Steigung der Geraden ermittelt. Korrelationskoeffizient der Verbindungsgeraden R = 0.98.

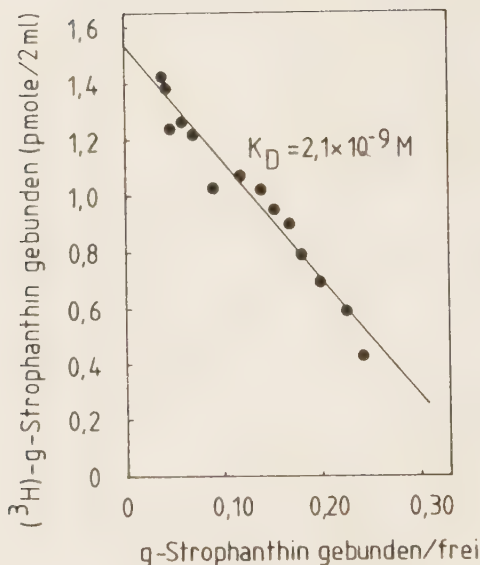


Abbildung 15:

Konzentrationsabhängige (³H)-g-Strophanthin-Bindung an Homogenate aus Moderatorband des Schafherzens.

Homogenat aus Moderatorband (0.83 g Feuchtgewicht, 0.71 mg Membranprotein/Ansatz, (Na⁺+K⁺)-ATPase-Aktivität 0.03 U/mg Protein, ca. 12 % spezifische Aktivität) wurden bei 37° C 5 h lang in 3mM MgCl₂, 3mM Imidazol/PO₄, 50mM Imidazol/HCl, pH 7.25, 1 x 10⁻¹⁰ M (³H)-g-Strophanthin und ansteigenden Konzentrationen (0 - 1.5⁻⁸ M) g-Strophanthin inkubiert. Gesamtvolumen 2 ml. Die Inkubationszeit wurde den Versuchen zur zeitabhängigen Bindung (siehe Abbildung 5) entnommen.

Bestimmung der proteingebundenen Radioaktivität durch rasche Filtration (Glasfaserfilter).

Unspezifische (³H)-g-Strophanthin-Bindung in Anwesenheit von 1 x 10⁻⁴ M g-Strophanthin < 0.001 %.

Die (³H)-g-Strophanthin-Bindungsdaten wurden nach der Methode von Scatchard aufgetragen und die Dissoziationskonstante, K_D, aus der negativen Steigung der Geraden ermittelt. Korrelationskoeffizient der Verbindungsgeraden R = 0.97.

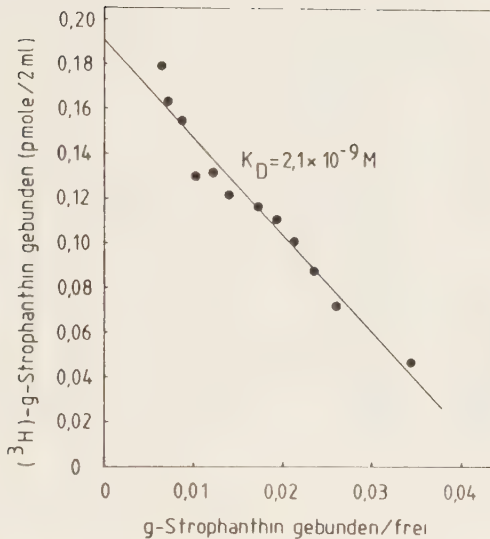


Abbildung 16:

Konzentrationsabhängige (³H)-g-Strophanthin-Bindung an Homogenat aus Purkinjefasern des Schafherzens.

Homogenat aus Purkinjefasern (1.0. g Feuchtgewicht, 0.034 mg Membranprotein/Ansatz, (Na⁺+K⁺)-ATPase-Aktivität 0.097 U/mg Protein, ca. 29 % spezifische Aktivität) wurden bei 37° C 5 h lang in 3mM MgCl₂, 3mM Imidazol/PO₄, 50mM Imidazol/HCl, pH 7.25, 1 x 10⁻⁹M (³H)-g-Strophanthin und ansteigenden Konzentrationen (0 - 1.0⁻⁸M) g-Strophanthin inkubiert. Gesamtvolumen 2 ml. Die Inkubationszeit wurde den Versuchen zur zeitabhängigen Bindung (siehe Abbildung 5) entnommen.

Bestimmung der proteingebundenen Radioaktivität durch rasche Filtration (Glasfaserfilter).

Unspezifische (³H)-g-Strophanthin-Bindung in Anwesenheit von 1 x 10⁻⁴M g-Strophanthin < 0.02 %.

Die (³H)-g-Strophanthin-Bindungsdaten wurden nach der Methode von Scatchard aufgetragen und die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante, K_D, aus der negativen Steigung der Geraden ermittelt. Korrelationskoeffizient der Verbindungsgeraden R = 0.98.

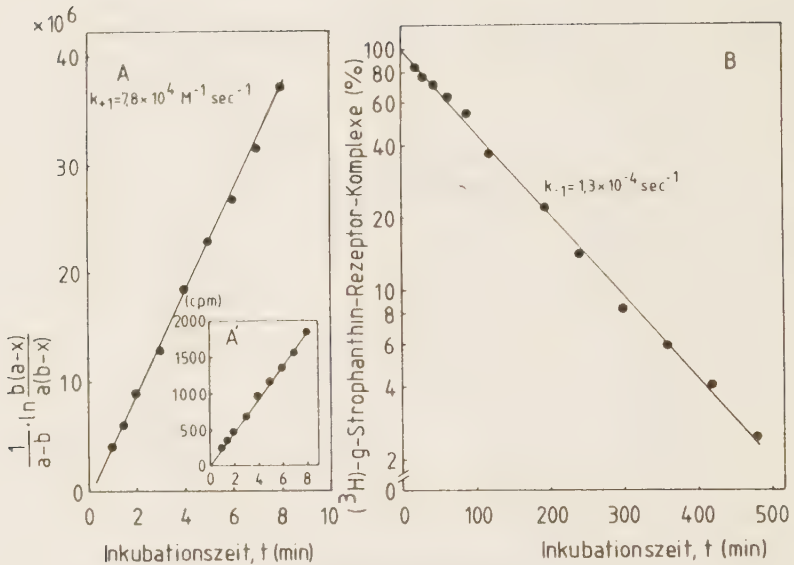


Abbildung 17:

Zeitabhängige Assoziation (A) und Dissoziation (B) von (^3H)-g-Strophanthin an Gewebehomogenat aus linkem Schafherzventrikel

A: Homogenat aus linkem Ventrikelmyokard [dasselbe Homogenat wurde zur "konzentrationsabhängigen Bindung" verwendet, 1.5 g Feuchtgewicht, 0.54 mg Membranprotein/Ansatz, ($\text{Na} + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität 0.02 U/mg Protein, ca. 22 % spezifische Aktivität] wurden bei 37°C unterschiedlich lange (0 - 8min) in 3mM MgCl_2 , 3mM Imidazol/ PO_4 , 50mM Imidazol/HCl, pH 7.25, $1 \times 10^{-9} \text{M}$ (^3H)-g-Strophanthin inkubiert. Gesamtvolumen 2 ml. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Homogenates gestartet und durch rasche Filtration (Glasfaserfilter) beendet.

Die Bindungsdaten (cpm, Abb. A') wurden in die Gleichung 2.Ordnung (siehe 3.1.4.1) eingesetzt und in Abhängigkeit von der Inkubationszeit, t (min), aufgetragen (Abb. A). In dieser Gleichung bedeuten:

- a = (^3H)-g-Strophanthin-Ausgangskonzentration (2.8 nM)
- b = Ausgangskonzentration des freien Rezeptors (0.32 nM)
- x = experimentell bestimmte Anzahl der (^3H)-g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexe (cpm) nach der Inkubationszeit, t (min).

Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante, $k_{+1} = 7.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$, (Korrelationskoeffizient, $R = 0.99$)¹ wurde aus der Steigung der Geraden berechnet.

B: Homogenat aus linkem Ventrikelmyokard (vgl. A, 18.9 mg Protein entsprechend 3.5 ml) wurde bei 37° C bis zum Erreichen von Äquilibriumbedingungen (5 h, siehe zeitabhängige Bindung Abbildung 5) in 3mM MgCl_2 , 3mM Imidazol/ PO_4 , 50mM Imidazol/HCl, pH 7.25 und $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ (^3H)-g-Strophanthin inkubiert - Gesamtvolumen 6.0 ml - und danach der freie vom protein-gebundenen Anteil des Liganden durch Zentrifugation (100 000 g, 30 min) getrennt. Das Sediment wurde in 6.0 ml kaltem Aqua bidest. homogenisiert und aliquote Anteile in 3mM MgCl_2 , 3mM Imidazol/ PO_4 , 50mM Imidazol/HCl, pH 7.25 und $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ g²-Strophanthin bei 37° C unterschiedlich lange (0 - 480 min) inkubiert. Gesamtvolumen 2 ml. Die Reaktion wurde durch rasche Filtration (Glasfaserfilter) gestoppt.

Die ermittelten (^3H)-g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexe (cpm) wurden halblogarithmisch in Abhängigkeit von der Inkubationszeit, t (min), aufgetragen.

Aus der negativen Steigung der Dissoziationsgeraden wurde die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante, $k_{-1} = 1.3 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$, (Korrelationskoeffizient der Verbindungsgeraden $R = 0.99$) und die Halbwertszeit der (^3H)-g-Strophanthin-Rezeptor-Bindung (88 min) ermittelt.

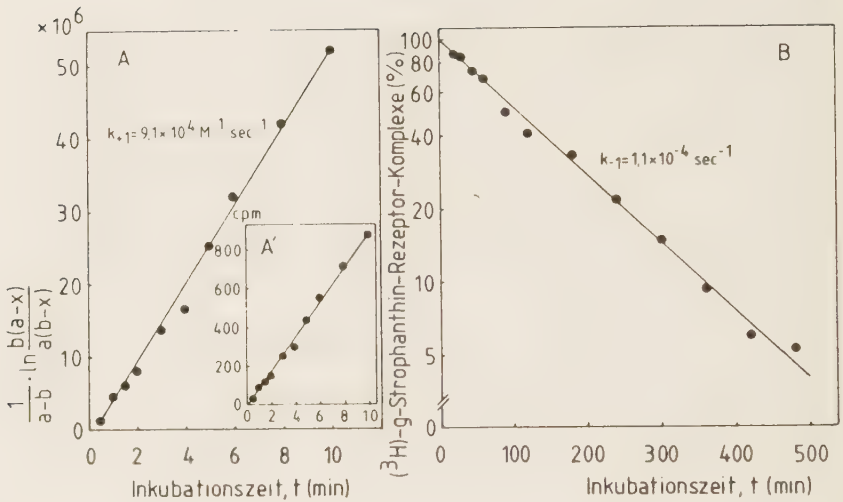


Abbildung 18:

Zeitabhängige Assoziation (A) und Dissoziation (B) von (^3H) -g-Strophanthin an Gewebehomogenat aus Moderatorband des Schafherzens

A: Homogenat aus Moderatorband [dasselbe Homogenat wurde zur "konzentrationsabhängigen Bindung" verwendet, 0.83 g Feuchtgewicht, 0.71 mg Membranprotein/Ansatz, $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität 0.03 U/mg Protein, ca. 12 % spezifische Aktivität] wurde bei 37°C unterschiedlich lange (0 - 10 min) in 3mM MgCl_2 , 3mM Imidazol/ PO_4 , 50mM Imidazol/ HCl , pH 7.25 und $1 \times 10^{-9} \text{M}^2$ (^3H) -g-Strophanthin inkubiert. Gesamtvolumen 2 ml.

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Homogenates gestartet und durch rasche Filtration (Glasfaserfilter) beendet.

Die Bindungsdaten (cpm, Abb. A') wurden in die Gleichung 2. Ordnung (siehe 3.1.4.1) eingesetzt und in Abhängigkeit von der Inkubationszeit, t (min), aufgetragen (Abb. A). In dieser Gleichung bedeuten:

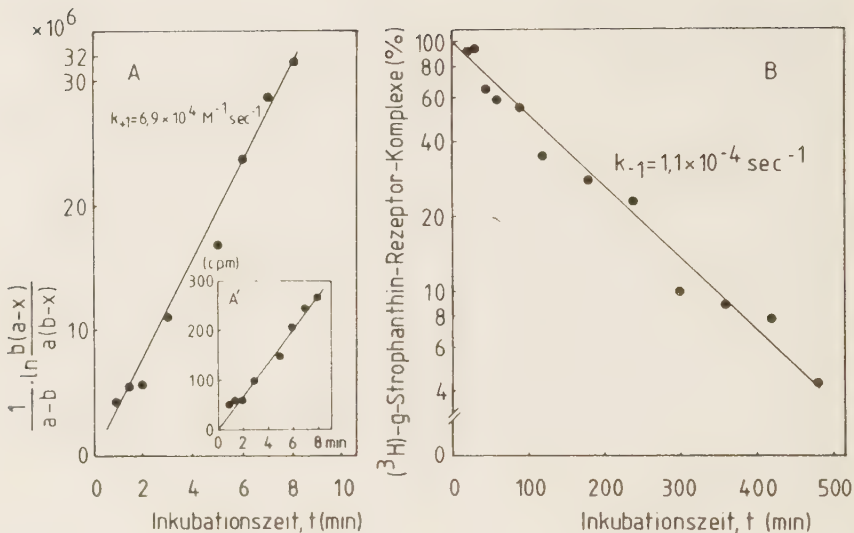
- a = (^3H) -g-Strophanthin-Ausgangskonzentration (2.8 nM)
- b = Ausgangskonzentration des freien Rezeptors (0.4 nM)
- x = experimentell bestimmte Anzahl der (^3H) -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexe (cpm) nach der Inkubationszeit, t (min).

Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante, $k_{+1} = 9.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, (Korrelationskoeffizient, $R = 0.99$) wurde aus der Steigung der Geraden berechnet.

B: Homogenat aus Moderatorband (vgl. A, 24.9 mg Protein entsprechend 3.5 ml) wurde bei 37° C bis zum Erreichen von Äquilibriumbedingungen (5 h, siehe zeitabhängige Bindung Abbildung 5) in 3mM MgCl₂, 3mM Imidazol/PO₄, 50mM Imidazol/HCl, pH 7.25 und 1×10^{-9} M (³H)-g-Strophanthin inkubiert - Gesamtvolumen 6.0 ml - und danach der freie vom proteingebundenen Anteil des Liganden durch Zentrifugation (100 000 g, 30 min) getrennt. Das Sediment wurde in 6.0 ml kaltem Aqua bidest. homogenisiert und aliquote Anteile in 3mM MgCl₂, 3mM Imidazol/PO₄, 50mM Imidazol/HCl, pH 7.25 und 1×10^{-4} M g-Strophanthin bei 37° C unterschiedlich lange (0 - 480 min) inkubiert. Gesamtvolumen 2 ml. Die Reaktion wurde durch rasche Filtration (Glasfaserfilter) gestoppt.

Die ermittelten (³H)-g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexe (cpm) wurden halblogarithmisch in Abhängigkeit von der Inkubationszeit, t (min), aufgetragen.

Aus der negativen Steigung der Dissoziationsgeraden wurde die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante, $k_{-1} = 9.1 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$, (Korrelationskoeffizient der Verbindungsgeraden R = 0.99) und die Halbwertszeit der (³H)-g-Strophanthin-Rezeptor-Bindung (88 min) ermittelt.



Abbildungung 19:

Zeitabhängige Assoziation (A) und Dissoziation (B) von $(^3\text{H})\text{-g-Strophanthin}$ an Gewebehomogenat aus Purkinjefasern des Schafherzens

A: Homogenat aus Purkinjefasern [dasselbe Homogenat wurde zur "konzentrationsabhängigen Bindung" verwendet, 1.0 g Feuchtgewicht, 0.034 mg Membranprotein/Ansatz, $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase-Aktivität}$ 0.097 U/mg Protein, ca. 29 % spezifische Aktivität] wurde bei 37°C unterschiedlich lange (0 - 8 min) in 3mM MgCl_2 , 3mM Imidazol/ PO_4 , 50mM Imidazol/ HCl , pH 7.25 und $1 \times 10^{-9} \text{M}$ $(^3\text{H})\text{-g-Strophanthin}$ inkubiert. Gesamtvolumen 2 ml.

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Homogenates gestartet und durch rasche Filtration (Glasfaserfilter) beendet.

Die Bindungsdaten (cpm, Abb. A') wurden in die Gleichung 2. Ordnung (siehe 3.1.4.1) eingesetzt und in Abhängigkeit von der Inkubationszeit, t (min), aufgetragen (Abb. A). In dieser Gleichung bedeuten:

a = $(^3\text{H})\text{-g-Strophanthin-Ausgangskonzentration}$ (2.8 nM)

b = Ausgangskonzentration des freien Rezeptors (0.5 nM)

x = experimentell bestimmte Anzahl der $(^3\text{H})\text{-g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexe}$ (cpm) nach der Inkubationszeit, t (min).

Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante, $k_1 = 6.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ (Korrelationskoeffizient, $R = 0.99$)¹ wurde aus der Steigung der Geraden berechnet.

B: Homogenat aus Purkinjefasern (vgl. A, 1.2 mg Protein entsprechend 3.5 ml) wurde bei 37° C bis zum Erreichen von Äquilibriumbedingungen (5 h, siehe zeitabhängige Bindung Abbildung 5) in 3mM MgCl₂, 3mM Imidazol/PO₄, 50mM Imidazol/ HCl, pH 7.25 und 1×10^{-9} M (³H)-g-Strophanthin inkubiert - Gesamtvolumen 6.0 ml - und danach der freie vom proteingebundenen Anteil des Liganden durch Zentrifugation (100 000 g, 30 min) getrennt. Das Sediment wurde in 6.0 ml kaltem Aqua bidest. homogenisiert und aliquote Anteile in 3mM MgCl₂, 3mM Imidazol/PO₄, 50mM Imidazol/HCl, pH 7.25 und 1×10^{-4} M g-Strophanthin bei 37° C unterschiedlich lange (0 - 480 min) inkubiert. Gesamtvolumen 2 ml. Die Reaktion wurde durch rasche Filtration (Glasfaserfilter) beendet.

Die ermittelten (³H)-g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexe (cpm) wurden halblogarithmisch in Abhängigkeit von der Inkubationszeit, t (min), aufgetragen.

Aus der negativen Steigung der Dissoziationsgeraden wurde die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante, $k_{-1} = 1.1 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$, (Korrelationskoeffizient R = 0.98) und die Halbwertszeit der (³H)-g-Strophanthin-Bindung (104 min) ermittelt.

3.2.2. Einfluß von Kalium auf die (^3H)-g-Strophanthin-Bindung

Aus dem klinischen Alltag ist bekannt, daß die Wirkung von Herzglykosiden durch die Kaliumkonzentration des Serums beeinflusst wird. So führt eine Erniedrigung der Kaliumkonzentration zu einer erhöhten Glykosidempfindlichkeit mit vermehrtem Auftreten von Intoxikationszeichen, während andererseits durch Gabe von Kalium eine bestehende Glykosidintoxikation therapeutisch behandelt werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bindung von (^3H)-g-Strophanthin an isolierte Zellmembranen des linken Ventrikelmyokards, des Moderatorbandes und von Purkinjefasern bei ansteigenden Kaliumkonzentrationen untersucht. Es zeigte sich, daß mit Zunahme der Kaliumkonzentration immer weniger (^3H)-g-Strophanthin bindet, bis bei 20mM die Bindung nur noch 20 % beträgt. Exemplarisch ist dies in Abbildung 20 für Zellhomogenate des linken Ventrikelmyokards und von Purkinjefasern zu sehen. Dieser Effekt läßt sich numerisch mit dem sogenannten IC_{50} -Wert ausdrücken, d. h. derjenigen Konzentration, die benötigt wird, um 50 % der maximalen (^3H)-g-Strophanthin-Bindung zu hemmen. Ein Vergleich dieser Werte weist dabei keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gewebearten oder Präparationen auf (Abbildung 21 - 24). Die Abbildungen 21 - 24 zeigen - bereits in der Auftragung nach Scatchard - die Ergebnisse ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-konzentrationsabhängiger (^3H)-g-Strophanthin-Bindungsstudien bei verschiedenen Kaliumkonzentrationen:

Die Glykosidbindung folgt bei Konzentrationen von 0mM bis 5mM Kalium einer Sättigungskinetik. Dabei wirkt sich bei allen Gewebe- und Präparationsarten der Effekt von Kalium ausschließlich auf die Steigung der Geraden - die Dissoziationskonstante, K_D - aus, nicht aber auf den Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate - die Bindungskapazität, B_{max} -, die im Rahmen des Meßtechnischen unverändert bleibt. Ein Unterschied im Ausprägungsgrad dieses Kaliumeffektes ist zwischen den einzelnen Gewebearten nicht zu erkennen.

Abbildung 25 zeigt exemplarisch für die (^3H)-g-Strophanthin-Bindung an isolierte Zellmembranen des linken Ventrikelmyokards, daß der Kaliumeffekt bei 3mM vorzugsweise auf einer Reduzierung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten beruht [k_{+1} von $1.3 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ (0mM K^+) auf 1.9×10^4 (3mM K^+)], die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante hingegen in dem gemessenen Konzentrationsbereich nahezu unbeeinflusst bleibt [k_{-1} von $1.8 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ (0mM) bzw. $2.0 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ (3mM)]. Zur Beantwortung der Frage, welcher Art nun die Interaktion von Kalium versus g-Strophanthin am Rezeptor ist, kann man sich der Methode nach Lineweaver und Burk (166) bedienen. Diese Auftragung bringt die Daten der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-konzentrationsabhängigen (^3H)-g-Strophanthin-Bindung in einen doppelt reziproken Zusammenhang (Abbildung 26):

Am Beispiel von Homogenat des Moderatorbandes wird erkennbar, daß auch bei dieser Methode sich Verbindungsgeraden unterschiedlicher Steilheit ergeben, wodurch abermals der affinitätsmindernde Effekt von Kalium bestätigt wird.

Die für uns wichtige Erkenntnis ergibt sich jedoch aus der Tatsache, daß sich die Geraden unterschiedlicher Kaliumkonzentration in demselben Punkt der y-Achse treffen, der Schnittpunkt mit der horizontalen x-Achse jedoch durch Kalium verändert wird.

Dies bedeutet, daß Kalium zumindest bis zu Konzentrationen von 5mM an den untersuchten Gewebearten des Schafherzens mittels kompetitiver Verdrängung die Bindung von (^3H)-g-Strophanthin an den Rezeptor beeinflusst.

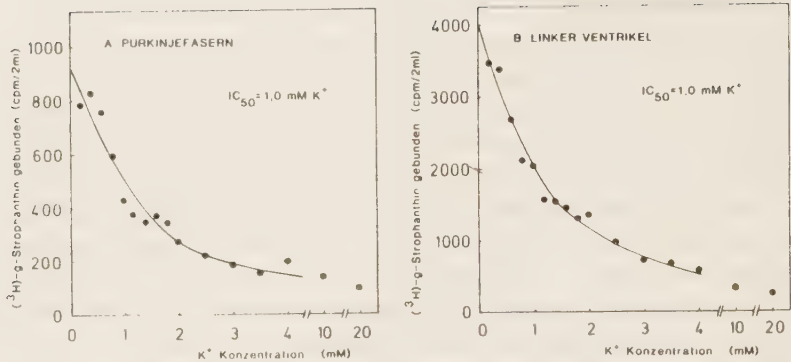


Abbildung 20:

Wirkung von Kalium auf die Bindung von $(^3H)\text{-g-Strophanthin}$ an Gewebekomogenate aus Purkinjefasern und aus Moderatorband des Schafherzens

Gewebekomogenat wurde bei 37°C 5 h lang in $3\text{mM } MgCl_2$, $3\text{mM Imidazol}/PO_4$, $50\text{mM Imidazol}/HCl$, pH 7.25, $1 \times 10^{-11} \text{M } (^3H)\text{-g-Strophanthin}$ und ansteigenden (0 - 20mM) Konzentrationen Kalium inkubiert. Gesamtvolumen 2 ml. Die Bestimmung der proteingebundenen Radioaktivität erfolgte durch rasche Filtration (Glasfaserfilter).

Die IC_{50} -Werte wurden graphisch ermittelt.

- A: Purkinjefasern.
 0.47 g Feuchtgewicht in 6 ml Pufferlösung (1mM EDTA);
 0.24 mg Protein/Ansatz, $(Na^+ + K^+)$ -ATPase-Aktivität 0.005 U/mg Protein, ca. 17 % spezifische Aktivität
 Unspezifische $(^3H)\text{-g-Strophanthin}$ -Bindung 0.05 %
- B: Moderatorband.
 0.59 g Feuchtgewicht in 8 ml Pufferlösung (1mM EDTA);
 1.0 mg Protein/Ansatz, $(Na^+ + K^+)$ -ATPase-Aktivität 0.02 U/mg Protein, ca. 16 % spezifische Aktivität
 Unspezifische $(^3H)\text{-g-Strophanthin}$ -Bindung 0.05 %

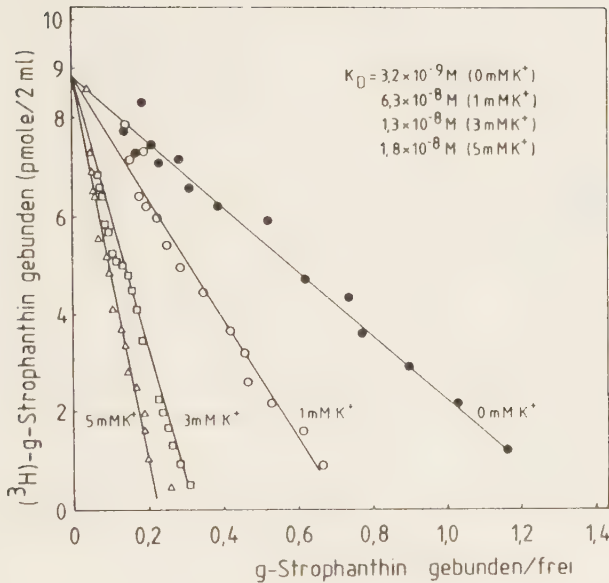


Abbildung 21:

Wirkung von Kalium auf die g-Strophanthin-konzentrationsabhängige Bindung von (^3H) -g-Strophanthin an isolierte Zellmembranen des linken Schafherzventrikels

Isolierte Zellmembranen [0.87 mg Membranprotein/Ansatz, $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität 0.43 U/mg Protein, ca. 96 % spezifische Aktivität] wurden bei 37°C 5 h lang in 3mM MgCl_2 , 3mM Imidazol/ PO_4 , 50mM Imidazol/HCl, pH 7.25, $1 \times 10^{-3}\text{M}$ (^3H) -g-Strophanthin und ansteigenden Konzentrationen ($0 - 1 \times 10^{-7}\text{M}$) g-Strophanthin in Versuchsreihen mit 0, 1, 3 und 5mM Kalium inkubiert. Gesamtvolumen 2 ml. Bestimmung der proteingebundenen Radioaktivität durch rasche Filtration (Glasfaserfilter).

Unspezifische (^3H) -g-Strophanthin-Bindung in Anwesenheit von $1 \times 10^{-4}\text{M}$ g-Strophanthin $< 0.009\%$.

Die Werte wurden nach der Methode von Scatchard aufgetragen und die Dissoziationskonstante, K_D , aus der negativen Steigung der Geraden ermittelt. Korrelationskoeffizient der Verbindungsgeraden $R > 0.97$.

$\text{IC}_{50} = 1.45\text{mM}$ Kalium

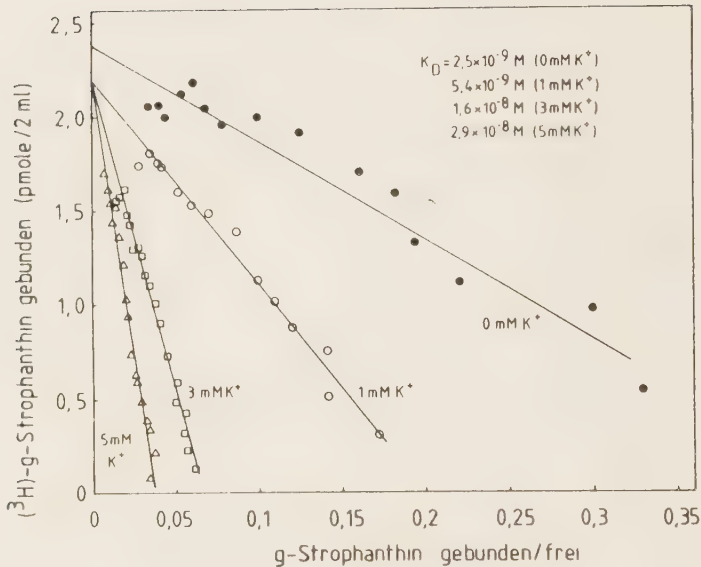


Abbildung 22:

Wirkung von Kalium auf g-Strophanthin-konzentrationsabhängige Bindung von (^3H) -g-Strophanthin an Gewebehomogenate des linken Schafherzventrikels

Homogenate aus linkem Ventrikelmyokard [1.4 g Feuchtgewicht in 30 ml Pufferlösung (1mM EDTA, pH 7.25), 0.67 mg Protein/Ansatz, $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität 7.5 nmol ATP-hydrolysiert/min/mg Protein, ca. 9 % spezifische Aktivität] wurden bei 37°C 5 h lang in 3mM MgCl_2 , 3mM Imidazol/ PO_4 , 50mM Imidazol/ HCl , pH 7.25, $1 \times 10^{-9}\text{M}^2$ (^3H) -g-Strophanthin und ansteigenden Konzentrationen ($0 - 1 \times 10^{-7}\text{M}$) g-Strophanthin in Versuchsreihen mit 0, 1, 3 und 5mM Kalium inkubiert. Gesamtvolumen 2 ml. Bestimmung der proteingebundenen Radioaktivität durch rasche Filtration (Glasfaserfilter).

Unspezifische (^3H) -g-Strophanthin-Bindung in Anwesenheit von $1 \times 10^{-4}\text{M}$ g-Strophanthin $< 1.4\%$.

Die Werte wurden nach der Methode von Scatchard aufgetragen und die Dissoziationskonstante, K_D , aus der negativen Steigung der Geraden ermittelt.

Korrelationskoeffizient der Verbindungsgeraden $R > 0.96$.

$\text{IC}_{50} = 0.95\text{mM}$ Kalium

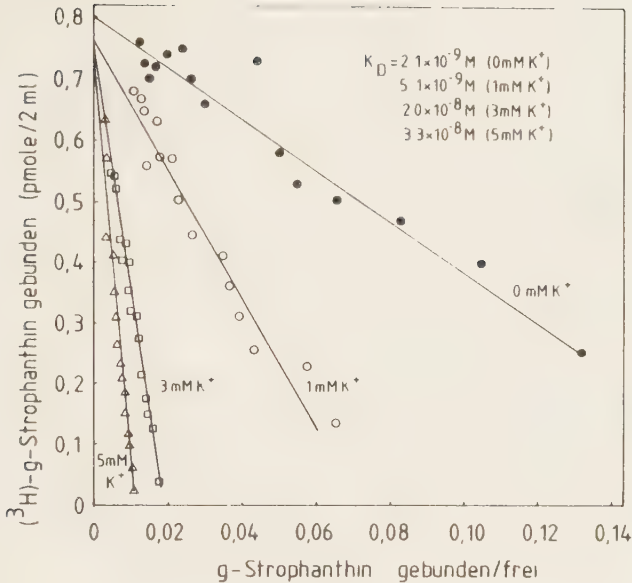


Abbildung 23:

Wirkung von Kalium auf die g-Strophanthin-konzentrationsabhängige Bindung von (^3H) -g-Strophanthin an Gewebekomponenten des Moderatorbandes des Schafherzens

Homogenate aus Moderatorband [1.2 g Feuchtgewicht in 20 ml Pufferlösung (1mM EDTA, pH 7.25), 0.75 mg Protein/Ansatz, $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 3.4 nmol ATP-hydrolysiert/ min/mg Protein, ca. 5.8 % spezifische Aktivität] wurden bei 37°C 5 h lang in 3mM MgCl_2 , 3mM Imidazol/ PO_4 , 50mM Imidazol/HCl, pH 7.25, $1 \times 10^{-9}\text{M}$ (^3H) -g-Strophanthin und ansteigenden Konzentrationen ($1 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-7}\text{M}$) g-Strophanthin in Versuchsreihen mit 0, 1, 3 und 5mM Kalium inkubiert. Gesamtvolumen 2 ml. Bestimmung der proteingebundenen Radioaktivität durch rasche Filtration (Glasfaserfilter).

Unspezifische (^3H) -g-Strophanthin-Bindung in Anwesenheit von $1 \times 10^{-4}\text{M}$ g-Strophanthin 0.05 %. Die Werte wurden nach der Methode von Scatchard aufgetragen und die Dissoziationskonstante, K_D , aus der negativen Steigung der Geraden ermittelt.

Korrelationskoeffizient der Verbindungsgeraden $R \geq 0.96$.

$\text{IC}_{50} = 1.05\text{mM}$ Kalium

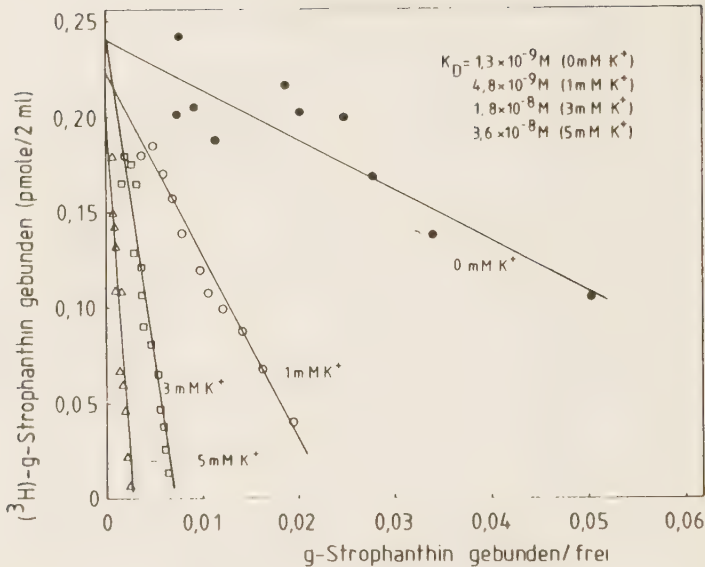


Abbildung 24:

Wirkung von Kalium auf die g-Strophanthin-konzentrationsabhängige Bindung von (^3H) -g-Strophanthin an Gewebehomogenate aus Purkinjefasern des Schafherzens

Homogenate aus Purkinjefasern [0.6 g Feuchtgewicht in 24 ml Pufferlösung (1mM EDTA, pH 7.25), 0.35 mg Protein/Ansatz, $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 3.3 nmol ATP-hydrolysiert/ min/mg Protein, ca. 13 % spezifische Aktivität] wurden bei 37°C 5 h lang in 3mM MgCl_2 , 3mM Imidazol/ PO_4 , 50mM Imidazol/HCl, pH 7.25, $1 \times 10^{-9} \text{M}$ (^3H) -g-Strophanthin und ansteigenden Konzentrationen ($0 - 1 \times 10^{-7} \text{M}$) g-Strophanthin in Versuchsreihen mit 0, 1, 3 und 5mM Kalium inkubiert. Gesamtvolumen 2 ml. Bestimmung der proteingebundenen Radioaktivität durch rasche Filtration (Glasfaserfilter).

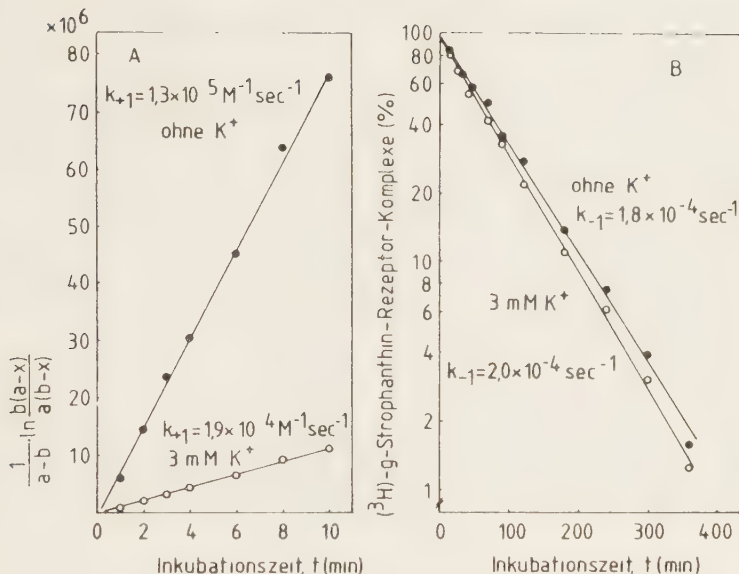
Unspezifische (^3H) -g-Strophanthin-Bindung in Anwesenheit von $1 \times 10^{-4} \text{M}$ g-Strophanthin 4.5 %.

Die Werte wurden nach der Methode von Scatchard aufgetragen und die Dissoziationskonstante, K_D , aus der negativen Steigung der Geraden ermittelt.

Korrelationskoeffizient der Verbindungsgeraden:

$R = 0.89$ (0mM K^+), 0.94 (1mM), 0.97 (3mM) und 0.90 (5mM).

$\text{IC}_{50} = 1.0 \text{mM}$ Kalium



Abbildungung 25:

Wirkung von Kalium auf die zeitabhängige Assoziation (A) und Dissoziation (B) von (³H)-g-Strophanthin an isolierten Zellmembranen des linken Schafherzventrikels

A: Isolierte Zellmembranen [dieselbe Membranpräparation wurde zur Kalium- und g-Strophanthin-konzentrationsabhängigen Bindung verwendet, 0.87 mg Membranprotein, (Na⁺+K⁺)-ATPase-Aktivität 0.43 U/mg Protein, ca. 96 % spezifische Aktivität] wurden bei 37° C unterschiedlich lange (0 - 10min) in 3mM MgCl₂, 3mM Imidazol/PO₄, 50mM Imidazol/HCl, pH 7.25, 1 × 10⁻⁹M (³H)-g-Strophanthin in Versuchsreihen mit 0mM und 3mM Kalium inkubiert. Gesamtvolumen 2 ml.

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Homogenates gestartet und durch rasche Filtration (Glasfaserfilter) beendet.

Die Bindungsdaten (cpm) wurden in die Gleichung 2.Ordnung (siehe 3.1.4.1) eingesetzt und in Abhängigkeit von der Inkubationszeit, t (min), aufgetragen. In dieser Gleichung bedeuten:

a = (³H)-g-Strophanthin-Ausgangskonzentration (2.8 nM)

b = Ausgangskonzentration des freien Rezeptors (4.4 nM)

x = experimentell bestimmte Anzahl der (³H)-g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexe (cpm) nach der Inkubationszeit, t (min).

Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten, $k_{+1} = 1.3 \times 10^5$ (0mM K⁺) bzw. $1.9 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ (3mM K⁺), (Korrelationskoeffizienten der Geraden $R = 0.99$) wurden aus der Steigung der Geraden berechnet.

B: Isolierte Zellmembranen (vgl. A, 30.5 mg Membranprotein entsprechend 3.5 ml) wurde bei 37° C bis zum Erreichen von Äquilibriumbedingungen (5 h) in 3mM MgCl₂, 3mM Imidazol/PO₄, 50mM Imidazol/HCl, pH 7.25 und $1 \times 10^{-9} \text{M}^2$ (³H)-g-Strophanthin inkubiert - Gesamtvolumen 6.0 ml - und danach der freie vom proteingebundenen Anteil des Liganden durch Zentrifugation (100 000 g, 30 min) getrennt. Die Sedimente wurde in 6.0 ml kaltem Aqua bidest. homogenisiert und aliquote Anteile in 3mM MgCl₂, 3mM Imidazol/PO₄, 50mM Imidazol/HCl, pH 7.25 und $1 \times 10^{-4} \text{M}$ g-Strophanthin in Versuchsreihen mit 0mM und 3mM Kalium bei 37° C unterschiedlich lange (0 - 360 min) inkubiert. Gesamtvolumen 2 ml. Die Reaktion wurde durch rasche Filtration (Glasfaserfilter) gestoppt.

Die ermittelten (³H)-g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexe (cpm) wurden halblogarithmisch in Abhängigkeit von der Inkubationszeit, t (min), aufgetragen.

Aus der negativen Steigung der Dissoziationsgeraden wurden die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten, $k_{-1} = 1.8 \times 10^{-4}$ (0mM K⁺) bzw. $2.0 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ (3mM K⁺), (Korrelationskoeffizient $R = 0.98$) und die Halbwertszeiten der (³H)-g-Strophanthin-Rezeptor-Bindung ermittelt [62 (0mM K⁺) bzw. 58 min (3mM K⁺)].

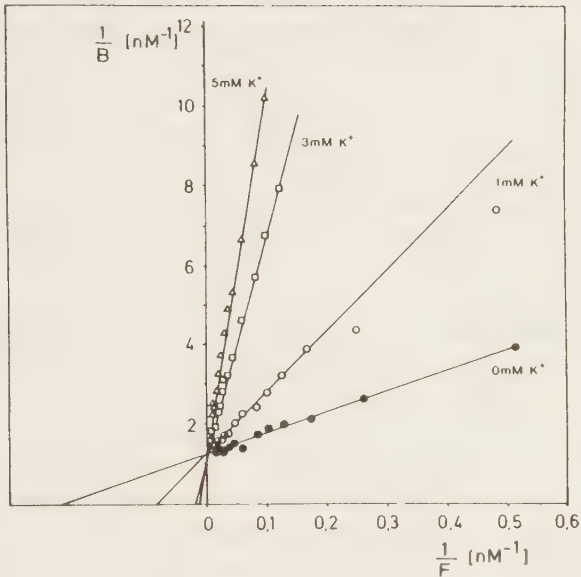


Abbildung 26

Wirkung von Kalium (0 - 5mM) auf die g-Strophanthin-konzentrationsabhängige (3H)-g-Strophanthin-Bindung an Gewebehomogenat aus Moderatorband des Schafherzens

Darstellung der Ergebnisse aus Abbildung 23 in der doppelt reziproken Auftragung nach Lineweaver und Burk.

$1/F = 1/g$ -Strophanthin frei (nM^{-1})

$1/B = 1/g$ -Strophanthin gebunden (nM^{-1})

3.2.3. Wirkung unterschiedlicher, unmarkierter Herzglykoside auf die (^3H)-g-Strophanthin-Bindung

In den bisherigen Versuchen kam als repräsentativ für die große Zahl der isolierten Herzglykoside (172) ausschließlich g-Strophanthin zur Anwendung.

Es besteht aber durchaus die Möglichkeit, daß erst bei Verwendung anderer, cardial wirksamer Glykoside unterschiedliche Glykosid-Rezeptor-Interaktionen innerhalb einer Spezies oder auch im Vergleich zweier Arten erkennbar werden.

Eine selektiv erhöhte Wirksamkeit auf das Reizleitungssystem wird seit einigen Jahren für die Substanz 16-epi(α)-Gitoxin postuliert (184).

Das Bindungsverhalten von Herzglykosiden an Zellmembranen direkt zu bestimmen ist bis heute nur durch die Verwendung der radioaktiv markierten Substanz möglich. Diese Markierung ist bisher nur für wenige Substanzen erhältlich.

Es konnte jedoch gezeigt werden, daß unter bestimmten Voraussetzungen - auf Grund der Hemmung bzw. Verdrängung der Bindung einer anderen, markierten Substanz durch eine unmarkierte Substanz - auf das Bindungsverhalten und die Wirkungsstärke dieses unmarkierten Glykosides rückgeschlossen werden darf (67, 258).

Deshalb wurde an Zellhomogenaten aus Purkinjefasern und linkem Ventrikelmyokard die Hemmung der (^3H)-g-Strophanthin-Bindung durch die unmarkierten Substanzen Dihydro-g-Strophanthin, Gitoxin, Gitaloxin und 16-epi(α)-Gitoxin untersucht.

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven für diese Substanzen sind in Abbildung 27 dargestellt und verlaufen annähernd parallel mit ähnlicher Steilheit wie g-Strophanthin und weisen somit darauf hin, daß diese Glykoside mit derselben Bindungsstelle interagieren. Die Konzentrationen (= IC_{50} -Werte), die die (^3H)-g-Strophanthin-Bindung um 50 % hemmten, wurden in Dissoziationskonstanten, K_D , der unmarkierten Glykoside umgerechnet (67, 133, 258). Tabelle 8 zeigt die Übereinstimmung der Affinitäten von Purkinjefasern und Ventrikelmyokard des Schafherzens für die jeweils verwendeten Substanzen.

In dieser Versuchsreihe konnte weder eine andere Bindungsstelle als der bereits durch die (^3H)-g-Strophanthin-Bindung charakterisierte Rezeptor nachgewiesen werden, noch ergab sich irgendein Hinweis auf eine Gewebeselektivität einer der verwendeten Substanzen. Die Reihenfolge der Wirkstärken bzw. der Affinitäten (K_D) lautet:

Gitaloxin > g-Strophanthin > Gitoxin > Dihydro-g-Strophanthin > 16α -Gitoxin.

Bereits in den Versuchen zur g-Strophanthin-konzentrationsabhängigen (^3H)-g-Strophanthin-Bindung hatte sich die kardiale ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase des Schafes derjenigen der digitalisempfindlichen Spezies Mensch als ähnlich erwiesen.

Deshalb wurde die Bindung von 14 unmarkierten Herzglykosiden unterschiedlicher chemischer Struktur (darunter auch die 5 an Zellhomogenaten untersuchten Substanzen) an isolierten Zellmembranen des linken Ventrikelmyokards des Schafherzens mit den erst kürzlich unter denselben Bedingungen erhobenen Befunden an isolierten Zellmembranen des menschlichen Myokards verglichen. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven (hier nicht gezeigt) verliefen analog den Versuchen mit Zellhomogenaten für alle Substanzen annähernd parallel zu der von g-Strophanthin - dadurch dieselbe Bindungsstelle anzeigend. Die Dissoziationskonstanten, K_D , die sich aus den IC_{50} -Werten der (^3H)-g-Strophanthin-Bindungs-Hemmung errechneten, sind in Tabelle 9 aufgelistet und den K_D -Werten, die von denselben Substanzen an isolierten Zellmembranen des Menschen-Herzens erhalten wurden, gegenübergestellt.

Mit der Wahl der Substanzen wurde ein relativ breites Wirkungsspektrum von Herzglykosiden abgedeckt, die sich um den Faktor von mehr als 10^3 in ihrer Wirkstärke unterscheiden: von $K_D = 1.0 \times 10^{-9}\text{M}$ (Gitaloxin) bis zu $K_D = 1.5 \times 10^{-6}\text{M}$ (Anhydrodigitoxigenin).

Bereits ein erster Vergleich der Dissoziationskonstanten läßt eine Übereinstimmung der Wirkstärken der einzelnen Substanzen an beiden Spezies vermuten. Dies läßt sich konkretisieren, indem man das Verhältnis der einer bestimmten Substanz entsprechenden K_D -Werte der beiden Spezies zueinander graphisch aufträgt (Abbildung 28).

Durch die Wertepunkte läßt sich eine Verbindungslinie legen, die sich nach Durchführung einer linearen Regressionsanalyse als Gerade ($Y = mx + t$) der Gleichung $Y = 0.98 x - 0.38$ mit einem Korrelationskoeffizienten von $R > 0.99$ ergibt.

Da die Steigung der Geraden ($m = 0.98$) im Rahmen einer engen Korrelation dem Wert von 1 sehr nahe kommt, bedeutet dies, daß die relativen Wirkungsstärken der einzelnen Substanzen auf Zellmembranen des Schafherzens und des Menschenherzens nahezu identisch sind.

Aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Y-Achse ($t = -0.38$) läßt sich errechnen, daß im Durchschnitt die Wirkungsstärke bzw. Affinität der untersuchten Substanzen absolut gesehen am Schafherzen um den Faktor 1.9 größer ist als am Menschenherzen.

Die Resultate der Versuche mit verschiedenen, unmarkierten, cardial wirksamen Glykosiden unterstützen damit die bereits erhobenen Befunde, denenzufolge sich die Glykosidrezeptoren im Schafherzen und im Menschenherzen ähneln.

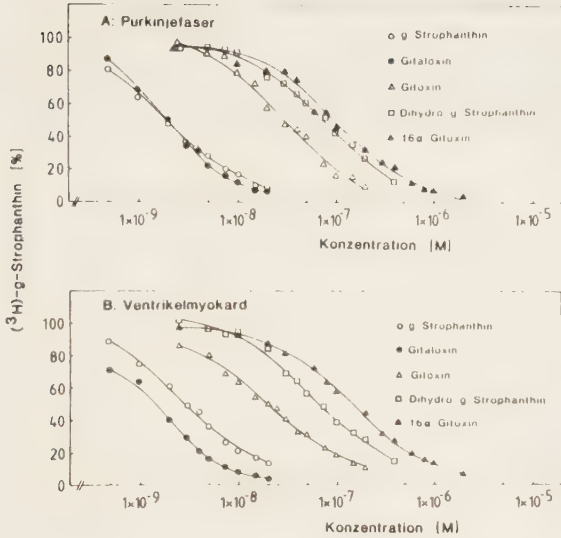


Abbildung 27:

Konzentrations-Wirkungs-Kurve für 5 unmarkierte Herzglykoside: Vergleich der konzentrationsabhängigen Hemmung der (^3H) -g-Strophanthin-Bindung an Zellhomogenaten aus Purkinjefasern (A) und linkem Ventrikelmuskard (B) des Schafherzens

A: Homogenat aus Purkinjefasern (0.85 g Feuchtgewicht in 15 ml Pufferlösung (1mM EDTA, pH 7.25), spezifische $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität 0.001 U/ml, ca. 2 % der Gesamtaktivität) wurde bei 37°C 5 h lang in 3mM MgCl_2 , 3mM Imidazol/ PO_4 , 50mM Imidazol/ HCl , pH 7.25, $1 \times 10^{-9}\text{M}$ (^3H) -g-Strophanthin und jeweils ansteigenden Konzentrationen von unmarkiertem g-Strophanthin ($\circ$), Gitaloxin ($\bullet$), Gitoxin (Δ), Dihydro-g-Strophanthin ($\square$) oder 16 α -Gitoxin ($\blacktriangle$) inkubiert. Gesamtvolumen 2 ml. Die Inkubationszeit wurde den Versuchen zur zeitabhängigen Bindung entnommen.

Bestimmung der proteingebundenen Radioaktivität durch rasche Filtration (Glasfaserfilter).

Unspezifische (^3H) -g-Strophanthin-Bindung in der Anwesenheit von $1 \times 10^{-4}\text{M}$ g-Strophanthin 0.9 %.

Maximale (^3H) -g-Strophanthin-Bindung bei $1 \times 10^{-9}\text{M}$ (^3H) -g-Strophanthin = 100 %.

B: Homogenat aus linkem Ventrikelmyokard [2.4 g Feuchtgewicht in 23 ml Pufferlösung, spezifische $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität 0.118 U/ml, ca. 14.5 % der Gesamtaktivität] wurde wie in A inkubiert und die Radioaktivität bestimmt.
Unspezifische Bindung = 1.3 %.

Der Graphik wurden die IC_{50} -Werte entnommen, d. h. diejenigen Konzentrationen der unmarklierten Substanzen bestimmt, die 50 % der (^3H) -g-Strophanthin-Bindung hemmten.

Tabelle 8:

Dissoziationskonstanten, K_D , für 5 unmarkierte Herzglykoside - Vergleich der konzentrationsabhängigen (^3H)-g-Strophanthin-Bindung an Zellhomogenate aus Purkinjefasern und linkem Ventrikelmyokard des Schafherzens

Substanz	Purkinjefaser K_D (M)	lk. Ventrikel- myokard K_D (M)
g-Strophanthin	$1.7 \pm 0.45 \times 10^{-9}$	$2.3 \pm 0.25 \times 10^{-9}$
Gitoxin	$1.8 \pm 0.35 \times 10^{-8}$	$2.0 \pm 0.38 \times 10^{-8}$
Gitaloxin	$1.5 \times 10^{-9} \times$	$1.7 \pm 0.44 \times 10^{-9}$
Dihydro-g-Strophanthin	$6.2 \pm 1.0 \times 10^{-8}$	$4.8 \pm 0.25 \times 10^{-8}$
16 α -Gitoxin	$1.0 \pm 0.3 \times 10^{-7}$	$9.9 \pm 0.05 \times 10^{-8}$

Die Dissoziationskonstanten, K_D , wurden nach der Methode von Erdmann und Schoner, 1974 (67), aus den IC_{50} -Werten der jeweiligen Substanzen errechnet.

Purkinjefaser-Zellhomogenate:

$$K_D = \bar{x} \pm \text{sem}; n = 2; \times : n = 1$$

Ventrikelmyokard-Zellhomogenate:

$$K_D = \bar{x} \pm \text{sem}; n = 3$$

Tabelle 9:

Dissoziationskonstanten, K_D , für 14 unmarkierte Herzglykoside - Vergleich der konzentrationsabhängigen (^3H)-g-Strophanthin-Bindung an isolierte Zellmembranen des menschlichen und des Schaf-Herzens

Nr. Substanz	Schaf		Mensch $\bar{x}$	
	K_D	(M)	K_D	(M)
1 g-Strophanthin	$2.2 \pm 0.3 \times 10^{-9}$		$3.7 \pm 0.3 \times 10^{-9}$	
2 Dihydro-g-Strophanthin	$4.8 \pm 0.6 \times 10^{-8}$		$1.2 \pm 0.3 \times 10^{-7}$	
3 Digitoxin	$1.5 \pm 0.3 \times 10^{-9}$		$2.8 \pm 0.3 \times 10^{-9}$	
4 Dihydrodigitoxin	$2.6 \pm 0.2 \times 10^{-8}$		$2.9 \pm 0.4 \times 10^{-8}$	
5 Digitoxigenin	$1.2 \pm 0.07 \times 10^{-8}$		$1.8 \pm 0.2 \times 10^{-8}$	
6 Anhydro-Digitoxigenin	$1.5 \pm 0.1 \times 10^{-6}$		$3.9 \pm 0.5 \times 10^{-6}$	
7 3 α -Methyl-Digitoxigenin-glucosid	$6.0 \pm 0.7 \times 10^{-8}$		$7.6 \pm 0.6 \times 10^{-8}$	
8 Neriifolin (Digitoxigenin-thevetosid)	$6.2 \pm 1.2 \times 10^{-10}$		$1.0 \pm 0.04 \times 10^{-9}$	
9 Digoxin	$2.5 \pm 0.3 \times 10^{-9}$		$6.2 \pm 0.3 \times 10^{-9}$	
10 Dihydrodigoxin	$1.3 \pm 0.1 \times 10^{-7}$		$1.8 \pm 0.3 \times 10^{-7}$	
11 Gitoxin	$1.0 \pm 0.2 \times 10^{-8}$		$1.7 \pm 0.3 \times 10^{-8}$	
12 16-Acetyl-Gitoxin	$1.2 \pm 0.03 \times 10^{-9}$		$2.8 \pm 0.3 \times 10^{-9}$	
13 Penta-Acetyl-Gitoxin	$7.7 \pm 0.7 \times 10^{-8}$		$1.4 \pm 0.3 \times 10^{-7}$	
14 Gitaloxin	$1.0 \pm 0.03 \times 10^{-9}$		$1.5 \pm 0.1 \times 10^{-9}$	

Die Dissoziationskonstanten, K_D ($\bar{x} \pm \text{sem}$, $n=3$; für g-Strophanthin $n=12$), wurden aus den IC_{50} -Werten nach der Methode von Erdmann und Schoner, 1974 (67), errechnet.

$\bar{x}$ aus: L. Brown und E. Erdmann, 1984 (36).

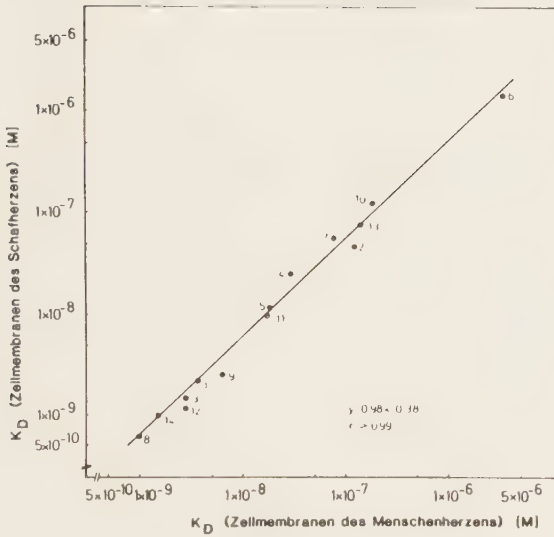


Abbildung 28:

Dissoziationskonstanten, K_D , für 14 unmarkierte Herzglykoside: Vergleich der Affinitäten zu isolierten Zellmembranen des Menschen- und Schaf-Herzens

Die K_D -Werte aus Tabelle 9 wurden graphisch aufgetragen und mit Hilfe einer linearen Regressionsanalyse eine Gerade, $y = mx + t$, mit $m = 0.98$ und $t = -0.39$ ermittelt. Korrelationskoeffizient $R = 0.99$. Die Zahlen 1 - 14 entsprechen den Nummern der Substanzen in Tabelle 9.

3.3. (^3H)-g-Strophanthin-Bindung und konzentrationsabhängige Wirkungen auf die Kontraktilität an elektrisch stimulierten, schlagenden Purkinjefasern und Moderatorbandstreifen

3.3.1. Vorbemerkung

Im vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, daß g-Strophanthin an Zellmembranen bindet und zu einer spezifischen Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase führt. Auf Grund der Korrelation von Bindung und Effekt des Pharmakons war es erlaubt von der Bindungsstelle als einem Rezeptor zu sprechen.

Da der therapeutisch erwünschte Effekt der Herzglykoside am Menschen großteils auf einer Steigerung der Schlagkraft des Herzens beruht - mithin einen positiv inotropen Effekt darstellt - lag es nahe, auch an verschiedenen Gewebearten des Schafherzens die Wirkungen von g-Strophanthin unter diesem Aspekt zu vergleichen.

Deshalb wurde die konzentrationsabhängige (^3H)-g-Strophanthin-Bindung und ihre Wirkung auf die Kontraktionskraft von elektrisch stimuliertem, schlagendem Ventrikelmyokard und schlagendem Reizleitungssystem untersucht.

Dabei leiteten prinzipiell folgende Fragen:

- 1) Welcher Konzentrationsbereich von g-Strophanthin führt am Schafherzen zu positiver Inotropie oder Toxizität?
- 2) Korreliert die Bindung von (^3H)-g-Strophanthin mit dem positiv inotropen Effekt der Herzglykoside?
- 3) Erfolgt die Bindung an schlagende Gewebearten des Schafherzens an eine einzige oder an mehrere Bindungsstellen-gattungen?
- 4) Welches Verhältnis besteht zwischen inotropem Effekt von g-Strophanthin und Bindungsstellenbesetzung?
- 5) Können die Kontraktionsversuche die Ergebnisse aus den Versuchen an Zellmembranen und -homogenaten bestätigen?
- 6) Lassen sich innerhalb dieser Fragestellungen Unterschiede zwischen schlagendem Reizleitungssystem und Arbeitsmyokard nachweisen?

Als repräsentativ für das Reizleitungssystem wurden - wie bereits in den vorangegangenen Versuchen - die frei verlaufenden Purkinjefasern des linken, selten auch des rechten Ventrikels gewählt und stellvertretend für das Arbeitsmyokard Teile des Moderatorbandes. Dieses verläuft frei im rechten Ventrikel und ist verschiedenen Autoren zufolge sowohl morphologisch als auch funktionell dem Arbeitsmyokard gleichzusetzen (122, 130, 131).

Auch die biochemischen Untersuchungen konnten keinen Unterschied zwischen Moderatorband und linkem bzw. rechtem Ventrikel aufzeigen (Tabelle 7).

Die Wahl fiel aus zwei Gründen auf das Moderatorband:

- 1) Nur in diesem Teil des Herzens verlaufen die Muskelfasern parallel. Für die Versuchsanordnung hatte dies den offensichtlichen Vorteil, daß - bei Aufhängung des Präparates in Faserrichtung - eine Steigerung der Kontraktilität auch adäquat aufgezeichnet werden konnte.
- 2) Das Moderatorband erreichte maximal einen Durchmesser von 1.5 - 3 mm, sodaß oft keine, nur manchmal 1 - 2 Schnittführungen in Faserrichtung nötig waren, um das Präparat den für diese Versuchsanordnung allgemein geforderten Maßen von maximal 0.8 mm Durchmesser anzupassen.

Der am Meerschweinchen oft verwendete Papillarmuskel ist im Schafherzen bereits zu umfangreich um in toto Verwendung zu finden; vielmehr hätte ein Gewebestück herausgeschnitten werden müssen mit allen Nachteilen der größtenteils verletzten - weil angeschnittenen - Oberflächen und eines unberechenbaren Anteiles quer bzw. schräg verlaufender Muskelfasern.

In einem Vorversuch wurde der Einfluß der Stimulationsfrequenz auf die Kontraktionskraft schlagenden Gewebes untersucht.

Bei einigen digitalissensitiven Spezies, nicht aber am vergleichsweise glykosidunempfindlichen Rattenherzen, nimmt mit steigender Frequenz bei sonst unveränderten Bedingungen die Kontraktionskraft zu (198).

Diese Kraftänderung, die sich bei plötzlichem Wechsel der Frequenz sprunghaft vollzieht, wird als "Treppeneffekt" bezeichnet. Das Phänomen wurde am Schafherzen, speziell an dessen Reizleitungssystem untersucht, indem schlagende Purkinjefasern nach der Äquilibrationsphase [60 min, Frequenz 0.5 Hz (zu den Bedingungen vgl. Erläuterungen der folgenden Versuche)] mit steigenden Frequenzen jeweils für die Dauer von 10 Minuten stimuliert und die Kontraktionskraft kontinuierlich aufgezeichnet wurde.

Abbildung 29 faßt die Ergebnisse zusammen:

An schlagenden Purkinjefasern des Schafherzens führt eine stufenweise Erhöhung der Frequenz ebenfalls stufenweise zu einem Anstieg der Kontraktionskraft. Der maximal mögliche, inotrope Effekt liegt in einem Bereich von 2.0 Hz, während eine Frequenz von 3.0 Hz bereits zu einer Überstimulation führte, die eine Abnahme der kontraktile Kraft zur Folge hatte.

Deshalb wurde in den nachfolgenden Kontraktionsstudien - in Übereinstimmung mit der Mehrzahl der auf diesem Forschungsgebiet tätigen Autoren - eine Frequenz von 1 Hz als elektrische Reizung von Purkinjefasern und Moderatorbandstreifen gewählt. Diese Frequenz liegt im Bereich des Ruhepulses von Schafen (ca. 70 - 80 Schläge/min), welcher wiederum in etwa dem des Menschen entspricht.

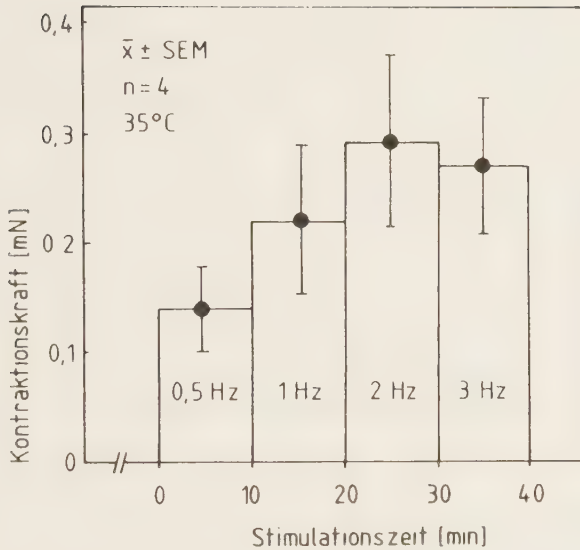


Abbildung 29:

Frequenzabhängigkeit der Kontraktionskraft schlagender Purkinjefasern des Schafherzens

Isolierte Purkinjefasern wurden in Tyrodelösung (75 ml; 1.8mM Ca^{2+} ; 35°C) mit Carbogen (95 % O_2 , 5 % CO_2) begast und während der Äquilibrierungsphase (ca. 60 min) mit einer Frequenz von 0.5 Hz (Dauer 5 msec, Spannung 10 - 20 % über dem Schwellenwert, ca. 5 - 15mV) elektrisch stimuliert.

Die Kontraktionskraft wurde kontinuierlich aufgezeichnet.

Nach der Äquilibrierungszeit wurde in Intervallen von 10 min die Frequenz der elektrischen Stimulation stufenweise erhöht.

Feuchtgewicht: 5.53 ± 0.50 ($\bar{x} \pm \text{sem}$; $n = 4$)

3.3.2. Zeitabhängigkeit und Konzentrationsabhängigkeit der Wirkungen von g-Strophanthin auf die Kontraktionskraft

Die Entwicklung der Kontraktionskraft schlagender Purkinjefasern und Moderatorbandstreifen bei kontinuierlicher, elektrischer Stimulation und ansteigenden g-Strophanthin-Konzentrationen über 120 Minuten ist in Abbildung 30 bis 33 dargestellt.

Ohne g-Strophanthin zeigte sich im Vergleich zur Ausgangskraft am Ende der Inkubationszeit ein Abfall der kontraktilen Kraft auf ca. 60 % (Purkinjefasern) bzw. 80 % (Moderatorbandstreifen). Dieser Kraftverlust wurde als Ermüdungszeichen unter Stimulation gewertet und die Versuchsdauer bei Versuchen mit g-Strophanthin auf diese Inkubationszeit von 120 min beschränkt, um umfangreichere Überlagerungseffekte von positiv inotroper g-Strophanthin-Wirkung und natürlicher Abnutzung zu vermeiden.

$1.2 \times 10^{-8} \text{ M}$ - diejenige Konzentration, die als Tritium-markiertes g-Strophanthin für Bindungsstudien verwendet wurde - führte weder bei schlagenden Purkinjefasern noch bei Moderatorbandstreifen zu einem statistisch signifikanten, inotropen Effekt.

Dieser konnte für beide Gewebearten erst bei einer Konzentration von $2 \times 10^{-8} \text{ M}$ beobachtet werden. Wie erwartet werden durfte, nahm die Kontraktionskraft mit steigenden g-Strophanthin-Konzentrationen stetig zu.

Von besonderem Interesse war hierbei der Kontraktionsverlauf bei $3 \times 10^{-7} \text{ M}$ g-Strophanthin:

Beide Gewebearten zeigten den maximalen, positiv inotropen Effekt, der ohne "deutliche" Zeichen von Toxizität erreichbar war. Innerhalb des 120-minütigen Versuchsverlaufes erfolgte nach Erreichen des Kontraktionskraftmaximums ein Abfall der Kraft mit deutlich höherer Geschwindigkeit als im Rahmen eines natürlichen Abnutzungseffektes zu erwarten gewesen wäre. Per

definitionem handelte es sich demnach um einen toxischen Effekt des Herzglykosides, jedoch traten keine anderen Kriterien der Toxizität (Arrhythmien oder Kontraktur), wie sie bei höheren g-Strophanthin-Konzentrationen regelmäßig beobachtet werden konnten, hinzu. Demnach kann sowohl für schlagende Purkinjefasern als auch Moderatorbandstreifen eine Konzentration von $3 \times 10^{-7} \text{M}$ g-Strophanthin als diejenige Dosis betrachtet werden, die sowohl zu einem maximalen, positiv inotropen Effekt ohne deutliche Zeichen von Toxizität führte, als auch den Schwellenwert zur Toxizität markierte. g-Strophanthin-Konzentrationen größer als $3 \times 10^{-7} \text{M}$ führten ausnahmslos zu Toxizität.

Bemerkenswert war bei den Versuchen am Schafherzen, daß ein Anstieg der diastolischen Kraft als Zeichen von Toxizität, wie er von verschiedenen Autoren bei Versuchen mit anderen Tierespezies berichtet werden konnte (249), bei keiner der toxischen g-Strophanthin-Konzentrationen am Schafherzen erfolgte. Ferner stellte sich die Frage, ob eine obere Grenze des positiv inotropen Effektes nachweisbar war, d. h. ob sich diejenige g-Strophanthin-Konzentration bestimmen ließ, bei der die maximal mögliche Kontraktionskraftzunahme erreicht war. Eine Aussage darüber hätte zum Beispiel getroffen werden können, falls bei vergleichsweise hohen g-Strophanthin-Konzentrationen die maximale Kontraktionskraftzunahme ein zeitliches Plateau aufgewiesen hätte, dem die toxische Wirkung gefolgt wäre. Ein Blick auf die Abbildungen 30 bis 33 zeigt indes deutlich, daß sowohl in schlagenden Purkinjefasern als auch in Moderatorbandstreifen bei ansteigenden g-Strophanthin-Konzentrationen selbst im toxischen Bereich die maximale Kontraktionskraft weiterhin zunimmt. Bei hochtoxischen Dosen jedoch überlagern sich die positive Inotropie und der Beginn der toxischen Wirkung, sodaß über die maximal erreichbare Kraftsteigerung keine eindeutige Aussage mehr möglich ist.

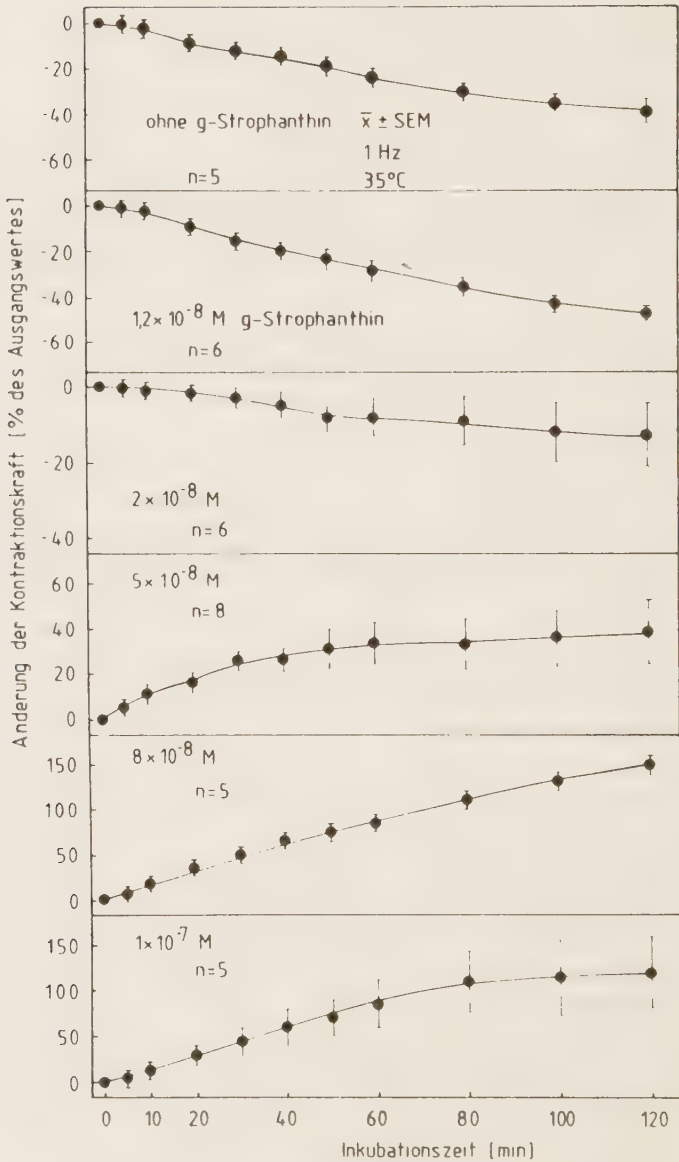


Abbildung 30:

Konzentrationsabhängige Wirkung von g-Strophanthin auf die Kontraktionskraft elektrisch stimulierter, schlagender Purkinjefasern des Schafherzens
Konzentrationsbereich: 0 - 1×10^{-7} M g-Strophanthin

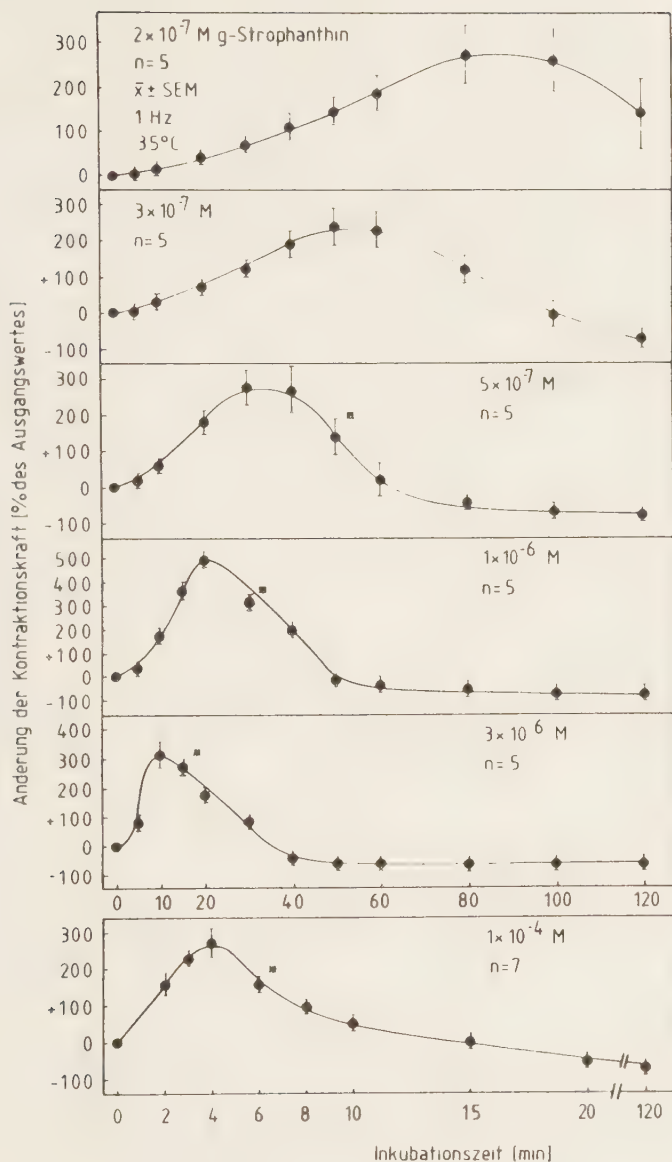


Abbildung 31:

Konzentrationsabhängige Wirkung von g-Strophanthin auf die Kontraktionskraft elektrisch stimulierter, schlagender Purkinjefasern des Schafherzens
 Konzentrationsbereich: 2×10^{-7} M - 1×10^{-4} M g-Strophanthin

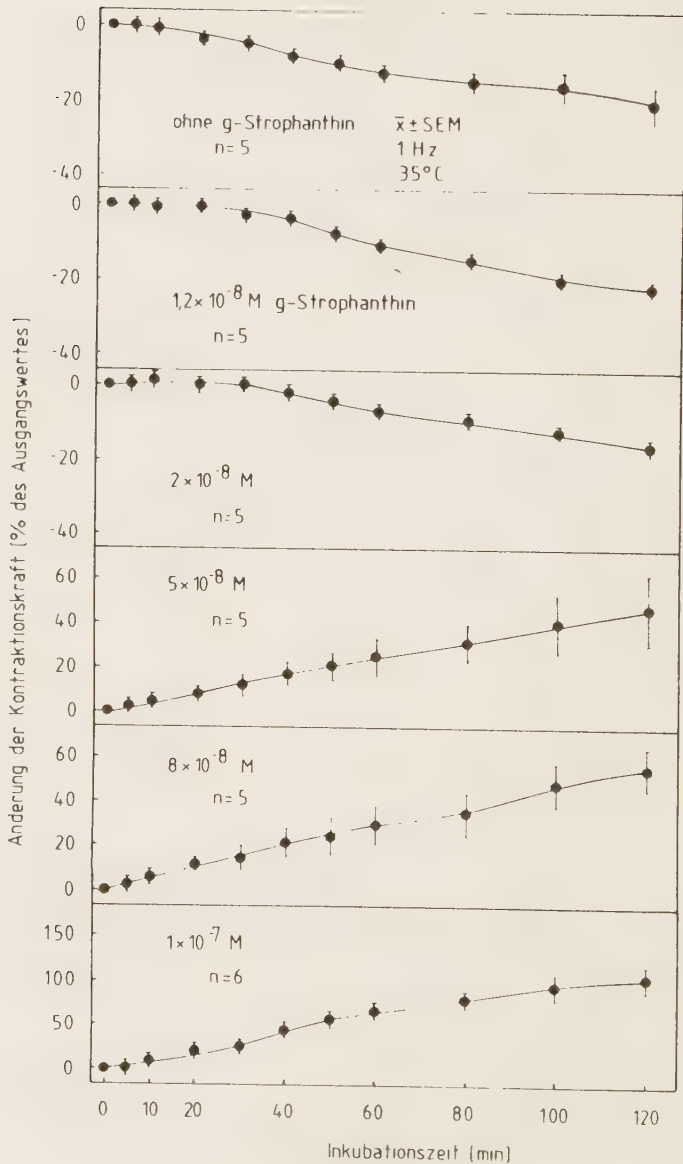


Abbildung 32:

Konzentrationsabhängige Wirkung von g-Strophanthin auf die Kontraktionskraft elektrisch stimulierter, schlagender Moderatorbandstreifen des Schafferherzens
Konzentrationsbereich: 0 - 1×10^{-7} M g-Strophanthin

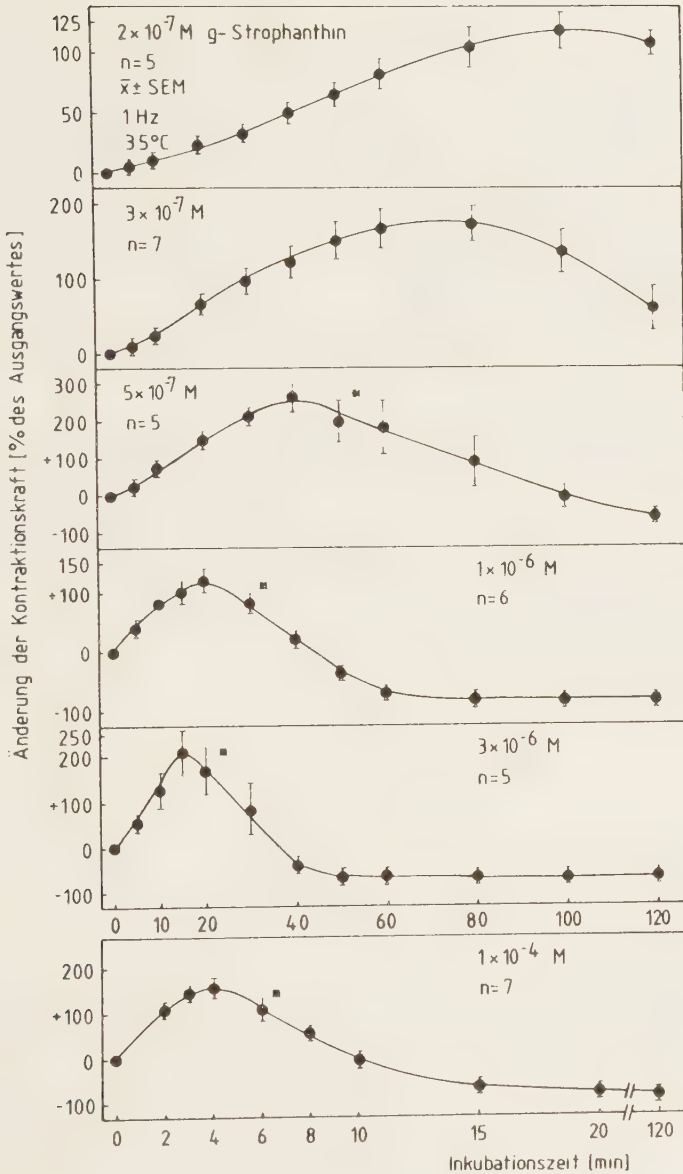


Abbildung 33:

Konzentrationsabhängige Wirkung von g-Strophanthin auf die Kontraktionskraft elektrisch stimulierter, schlagender Moderatorbandstreifen des Schafherzens
 Konzentrationsbereich: $2 \times 10^{-7} \text{ M}$ - $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ g-Strophanthin

Abbildungen 30 - 33 (gemeinsamer Kommentar)

Konzentrationsabhängige Wirkung von g-Strophanthin auf die Kontraktionskraft elektrisch stimulierter, schlagender Purkinjefasern und Moderatorbandstreifen des Schafherzens

Isolierte Purkinjefasern und Moderatorbandstreifen wurden in Krebs-Henseleit-Lösung (75 ml, 1.8mM Ca^{2+} , 35° C) mit Carbogen (95 % O_2 , 5 % CO_2) begast und elektrisch stimuliert (Frequenz 1 Hz, Dauer 5 msec, Spannung 10 - 20 % über dem Schwellenwert, ca. 5 - 15 V).

Nach der Äquilibrierungsphase (60 min) wurde das Gewebestück mit der angegebenen g-Strophanthin-Konzentration über 120 min inkubiert und die Entwicklung der Kontraktionskraft kontinuierlich aufgezeichnet.

Kontraktionskraft ($\bar{x} \pm \text{sem}$) nach der Äquilibrierungsphase bzw. vor Versuchsbeginn: 0.45 ± 0.06 mN (n = 64, Purkinjefasern) bzw. 1.9 ± 0.2 mN (n = 66, Moderatorbandstreifen)

Feuchtgewicht ($\bar{x} \pm \text{sem}$):

5.6 ± 0.9 mg (n = 64, Purkinjefasern) bzw.

8.2 ± 1.3 mg (n = 66, Moderatorbandstreifen)

Jede Kurve ergibt sich aus den Durchschnittswerten ($\bar{x} \pm \text{sem}$) aus 5 - 7 Versuchen.

(*) markiert das Auftreten von Arrhythmien als dem eindeutigen Zeichen von Toxizität.

Abbildung 34 greift die Resultate aus Abbildung 30 bis 33 noch einmal auf und veranschaulicht die maximal meßbare Kontraktionskraftzunahme für Purkinjefasern und Moderatorbandstreifen bei ansteigenden g-Strophanthin-Konzentrationen.

Diese Auftragung zeigt eindrucksvoll, daß die Glykosidempfindlichkeit beider schlagender Gewebearten identisch ist:

Der positiv inotrope Effekt tritt in beiden Geweben über denselben Konzentrationsbereich auf, wobei der Anfang der positiv inotropen Wirkung bei $2 \times 10^{-8} \text{ M}$, das Kontraktionsmaximum ohne deutliche Zeichen von Toxizität bei $3 \times 10^{-7} \text{ M}$ g-Strophanthin liegt.

Das Maximum des positiv inotropen Effektes ohne jegliche Zeichen von Toxizität kann bei $2 \times 10^{-7} \text{ M}$ beobachtet werden. Daraus errechnet sich die halbmaximale Kontraktionskrafterhöhung für beide Gewebearten bei g-Strophanthin-Konzentrationen von ca. $7 - 8 \times 10^{-8} \text{ M}$.

Es bleibt noch anzumerken, daß die prozentual größere Zunahme der Kontraktionskraft bei Purkinjefasern im Vergleich zu Moderatorbandstreifen nicht auf eine höhere Empfindlichkeit hinweist, sondern auf Unterschiede beispielsweise in der Höhe der Ausgangskraft und im Verhältnis Präparatlänge/Präparatdurchmesser zurückgeführt werden kann.

Bereits die Abbildungen 30 - 33 lassen erkennen, daß in beiden schlagenden Geweben mit ansteigenden g-Strophanthin-Konzentrationen sowohl das Maximum des positiv inotropen Effektes früher eintritt als auch - bei höheren Konzentrationen - die toxischen Wirkungen zunehmend früher beginnen.

Abbildung 35 verdeutlicht diesen konzentrationsabhängigen Effekt für g-Strophanthin-Konzentrationen $\geq 2 \times 10^{-7} \text{ M}$.

Niedrigere Konzentrationen führen entweder mit Beendigung der Inkubationszeit zum Kontraktionsmaximum oder erreichen den vollen, positiv inotropen Effekt während dieser Zeit nicht sicher. Auf eine Verlängerung der Versuchsdauer wurde jedoch verzichtet, da eine zunehmende Überlagerung des positiv inotropen Effektes mit Ermüdungserscheinungen am Präparat eine sichere Beurteilung der Kontraktionskraft nicht mehr zugelassen hätte.

Die selektive Auftragung der zeitlichen Verschiebung von maximalem, positiv inotropem Effekt und Beginn der Toxizität deutete zum ersten Mal innerhalb der Kontraktionsversuche auf einen Unterschied zwischen Purkinjefasern und Moderatorbandstreifen hin:

Bei jeder der untersuchten g-Strophanthin-Konzentrationen traten maximale Kontraktionskraft und Toxizität in schlagenden Purkinjefasern früher als in Moderatorbandstreifen auf. Diese Unterschiede wiesen jedoch nur bei $3 \times 10^{-7} \text{M}$ und $3 \times 10^{-6} \text{M}$ g-Strophanthin im student's t-test statistische Signifikanz auf. Eventuell hätten andere statistische Verfahren (z. B. Richtungstests) die Signifikanz erhöhen können, doch wurde mit Rücksicht auf die Klarheit der Aussage darauf verzichtet.

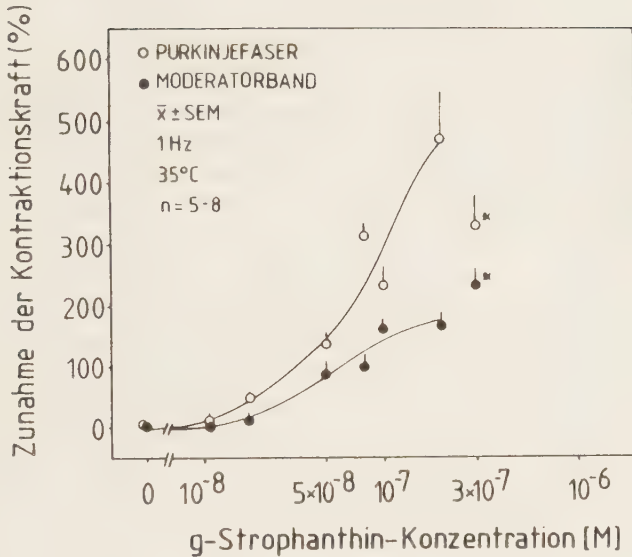


Abbildung 34:

Konzentrationsabhängigkeit der maximalen, positiv inotropen Wirkung von g-Strophanthin an schlagenden Purkinjefasern und Moderatorbandstreifen

Der maximale, positiv inotrope Effekt, der in den Kontraktionsverläufen von Abbildung 30 - 33 für verschiedene g-Strophanthin-Konzentrationen an schlagenden Purkinjefasern und Moderatorbandstreifen beobachtet werden konnte, wurde gegen die ansteigenden g-Strophanthin-Konzentrationen aufgetragen.

(x) markiert das Auftreten deutlicher Zeichen von Toxizität.

Jeder Kurvenpunkt bildet den Mittelwert, $\bar{x} \pm \text{sem}$, aus 5 - 7 Einzelmessungen. Jedes Gewebepreparat wurde nur für eine g-Strophanthin-Konzentration verwendet.

Für Versuchsbedingungen und Kontraktionsverläufe siehe Abbildung 30 - 33.

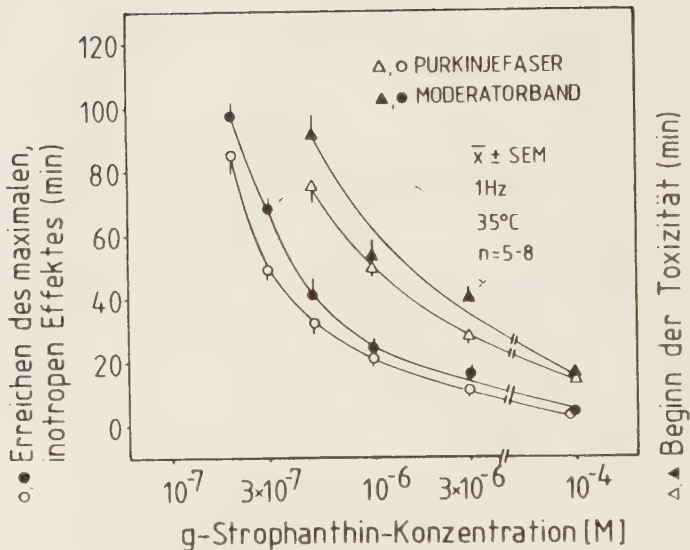


Abbildung 35:

Konzentrationsabhängige Wirkung von g-Strophanthin auf das zeitliche Eintreten von maximalem, positiv inotropem Effekt und Toxizität an schlagenden Purkinjefasern und Moderatorbandstreifen

Die zeitliche Dauer bis zum Erreichen der maximalen, inotropen Wirkung ($\circ, \bullet$) bzw. der Toxizität ($\Delta, \blacktriangle$), die in den Kontraktionsverläufen von Abbildung 30 - 33 für verschiedene g-Strophanthin-Konzentrationen an schlagenden Purkinjefasern (offene Symbole) und Moderatorbandstreifen (geschlossene Symbole) beobachtet werden konnte, wurde gegen die ansteigenden g-Strophanthin-Konzentrationen aufgetragen.

(x) markiert einen statistisch signifikanten Unterschied bei dieser g-Strophanthin-Konzentration (student's test, $p = 0.05$).

Die Meßpunkte sind als Mittelwerte, $\bar{x} \pm \text{sem}$, aus 5 - 7 Einzelmessungen wiedergegeben. Jedes Gewebepreparat wurde nur für eine g-Strophanthin-Konzentration verwendet. Für Versuchsbedingungen und Kontraktionsverläufe siehe Abbildung 30 - 33.

3.3.3. Konzentrationsabhängige (^3H)-g-Strophanthin-Bindung
- Bestimmung der Dissoziationskonstanten, K_D , und
der Anzahl der Bindungsstellen

In den vorausgegangenen Versuchen zur konzentrationsabhängigen Kontraktionskrafterhöhung in schlagenden Purkinjefasern und Moderatorbandstreifen setzte sich die jeweilige g-Strophanthin-Konzentration immer aus einer konstanten Menge von (^3H)-g-Strophanthin ($1.2 \times 10^{-8} \text{M} = \text{ca. } 1.8 \times 10^7 \text{cpm}$) zusammen, die mit unmarkiertem g-Strophanthin auf die gewünschte Glykosidkonzentration ergänzt wurde.

Dieses Vorgehen hatte zum Ziel, nicht nur die Wirkungen von g-Strophanthin auf schlagende Gewebe zu untersuchen, sondern in demselben Versuch auch Aussagen über die dabei erfolgende Bindung von (^3H)-g-Strophanthin an diese Gewebe treffen zu können. Sollte sich die Beziehung von Bindung und pharmakologischer Wirkung des Herzglykosides, die bei den Versuchen an Zellmembranen und Zellhomogenaten nachweisbar war, bestätigen, so müßte bei ansteigenden g-Strophanthin-Konzentrationen mit einem veränderten Kontraktionsverhalten des schlagenden Präparates auch eine veränderte (^3H)-g-Strophanthin-Bindung an dieses Präparat einhergehen.

Abbildung 36 zeigt in der Auftragung nach Scatchard (Spezifität der Glykosid-Bindung $> 90 \%$), daß mit Erhöhung des unmarkierten g-Strophanthins - und damit niedriger werdendem Verhältnis g-Strophanthin gebunden/frei - das gebundene (^3H)-g-Strophanthin an schlagenden Purkinjefasern und Moderatorbandstreifen abnimmt (zur Kontraktionskraftmessung vgl. Abbildung 30 - 33). Für beide schlagende Gewebe kann eine Gerade ermittelt werden (Korrelationskoeffizient $R = 0.98$) - d. h., daß die Empfindlichkeit für (^3H)-g-Strophanthin konzentrationsunabhängig bleibt.

Dies bestätigt den bereits in den biochemischen Untersuchungen an Zellmembranen und Zellhomogenaten erhobenen Befund, daß sowohl in Purkinjefasern als auch Moderatorbandstreifen nur eine einzige Bindungsstellenart für Herzglykoside existiert.

Die Dissoziationskonstanten, K_D , als Maß der Affinität bzw. der Empfindlichkeit der Bindungsstelle für (^3H)-g-Strophanthin weisen nach der Methode von Scatchard mit $3.4 \times 10^{-7}\text{M}$ (Purkinjefaser) und $3.5 \times 10^{-7}\text{M}$ (Moderatorbandstreifen) keinen signifikanten Unterschied auf.

Zur Überprüfung der Befunde wurden die Bindungsdaten auch nach den Methoden von Woolf und Hill analysiert [Abbildungen 37 und 38 (vgl. hierzu auch 3.1.6)].

Die lineare Auftragung nach Woolf bestätigt, daß (^3H)-g-Strophanthin in beiden schlagenden Gewebearten an eine einzige Rezeptorenart bindet. Die Berechnung der Dissoziationskonstanten, K_D , [Purkinjefasern $3.2 \times 10^{-7}\text{M}$ (Woolf) bzw. $3.4 \times 10^{-7}\text{M}$ (Scatchard); Moderatorband: $2.6 \times 10^{-7}\text{M}$ (Woolf) bzw. $2.5 \times 10^{-7}\text{M}$ (Scatchard)] stimmen ebenfalls annähernd überein.

Die Auftragungen nach Hill (Abbildung 38) ergeben weder graphisch noch rechnerisch einen Hinweis auf Heterogenität der Bindungsstellen oder negative bzw. positive Kooperativität:

Die Graphen beschreiben Geraden (Korrelationskoeffizient $R = 0.99$ für beide Auftragungen) und der Hill-Koeffizient, N_H , liegt in beiden Auftragungen bei Werten um 1.0 [$N_H = 1.1$ (Purkinjefaser) bzw. 1.0 (Moderatorband)].

Ein Vergleich mit den Dissoziationskonstanten aus Zellhomogenaten [$K_D = 1.9 \times 10^{-9}\text{M}$ (Purkinjefaser) und $2.1 \times 10^{-9}\text{M}$ (Moderatorband)] zeigt jedoch für schlagende Gewebepreparate eine um den Faktor ca. 100 geringere Glykosidempfindlichkeit. Dieses Phänomen, das auch von Experimenten mit menschlichem Herzmuskelgewebe berichtet werden konnte, wird noch zu diskutieren sein.

Vergleicht man die prozentuale Bindungsstellenbesetzung mit dem positiv inotropen Effekt von g-Strophanthin, so zeigt sich, daß $3 \times 10^{-7}\text{M}$ g-Strophanthin, also diejenige Konzentration, die in beiden schlagenden Geweben der Dissoziationskonstanten, K_D , entspricht - d. h. bei der 50 % der Bindungsstellen besetzt sind - sowohl in schlagenden Purkinjefasern als auch Moderatorbandstreifen zum maximalen, positiv inotropen Effekt ohne deutliche Zeichen von Toxizität führt.

Auf Grund der Korrelation von Bindungsstellenbesetzungen und positiv inotropem Effekt ist es nun auch an schlagenden Gewebearten des Schafherzens erlaubt, von der Glykosidbindungsstelle als dem Glykosidrezeptor zu sprechen.

Trotz gleicher Affinität der Rezeptoren ergibt die Anzahl der Bindungsstellen pro Gramm Feuchtgewicht (ermittelt aus der Auftragung nach Scatchard), daß schlagende Purkinjefasern über weniger Bindungsstellen pro Gramm Feuchtgewicht (1.99×10^{14}) verfügen als schlagende Moderatorbandstreifen (3.9×10^{14}).

Dieser Befund deutete sich bereits aus den Ergebnissen an Zellhomogenaten an und korrespondiert mit der geringeren (^3H)-g-Strophanthin-Bindungsstellenzahl in Purkinjefasern ($0.33 \times 10^{14}/\text{g}$ Feuchtgewicht) gegenüber dem Moderatorband ($1.1 \times 10^{14}/\text{g}$ Feuchtgewicht). An beiden schlagenden Gewebearten können demnach keine qualitativen Unterschiede der Glykosidrezeptoren, sehr wohl aber quantitative nachgewiesen werden.

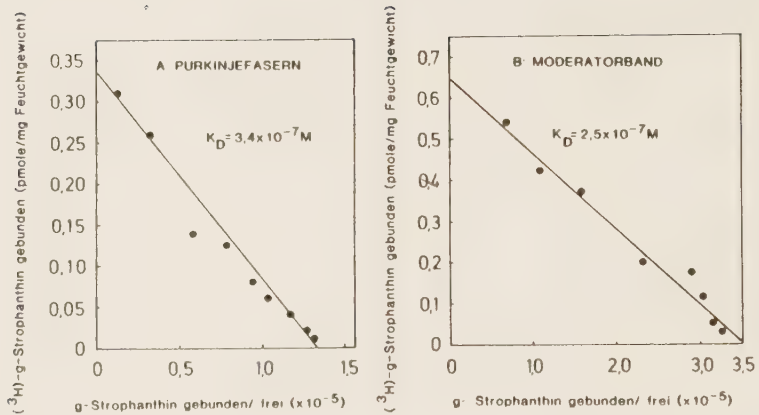


Abbildung 36:

g-Strophanthin-konzentrationsabhängige Bindung von (^3H) -g-Strophanthin an schlagende Purkinjefasern und Moderatorbandstreifen des Schafherzens
- Auftragung nach Scatchard

Elektrisch gereizte (1 Hz, 5 msec), schlagende Purkinjefasern (A) und Moderatorbandstreifen (B) wurden mit (^3H) -g-Strophanthin (ca. $1.2 \times 10^{-8} \text{ M}$, entsprechend $1.8 \pm 1.7 \times 10^7$ cpm in 75 ml) und ansteigenden Konzentrationen unmarkierten g-Strophanthins inkubiert (120 min, 35°C). Für Versuchsbedingungen und Kontraktionsverläufe siehe Abbildungen 30 - 33. Jeder Punkt ergibt sich als Mittelwert ($\bar{x} \pm \text{sem}$) aus 5 - 7 Bestimmungen.

- A: Purkinjefasern (n = 64)
Maximale (^3H) -g-Strophanthin-Bindung = 263 ± 12.3 cpm/mg
Unspezifische (^3H) -g-Strophanthin-Bindung = 25 ± 2.7 cpm/mg, ca 9.5 % der Gesamtbindung
Korrelationskoeffizient der Bindungsgeraden $R = -0.98$
- B: Moderatorbandstreifen (n = 66)
Maximale (^3H) -g-Strophanthin-Bindung = 635 ± 14.5 cpm/mg
Unspezifische (^3H) -g-Strophanthin-Bindung = 49 ± 3.0 cpm/mg, ca 7.7 % der Gesamtbindung
Korrelationskoeffizient der Bindungsgeraden $R = -0.99$

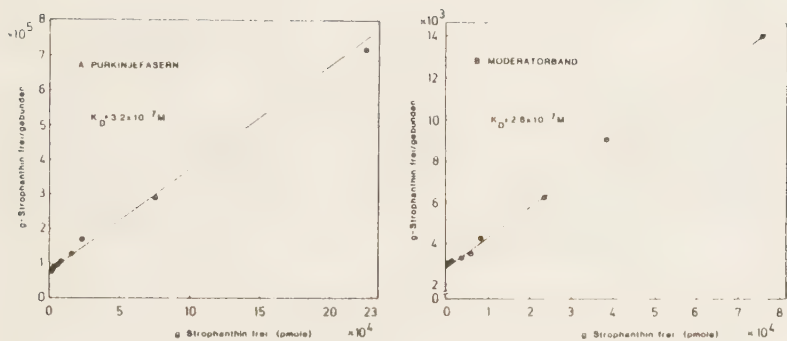


Abbildung 37:

g-Strophanthin-konzentrationsabhängige Bindung von (3H)-g-Strophanthin an schlagende Purkinjefasern und Moderatorbandstreifen des Schafherzens
- Auftragung nach Woolf

Die Bindungsdaten aus Abbildung 36 wurden nach der Methodik von Woolf (Ligandenkonz. frei/gebunden / Ligandenkonz. frei) aufgetragen. Für Versuchsbedingungen und Kontraktionsverläufe siehe Abbildungen 30 - 33.

A: Purkinjefasern

$$K_D = 3.2 \times 10^{-7} M$$

$$B_{max} = 0.32 \text{ pmole/2 ml}$$

B: Moderatorbandstreifen

$$K_D = 2.6 \times 10^{-7} M$$

$$B_{max} = 0.67 \text{ pmole/2 ml}$$

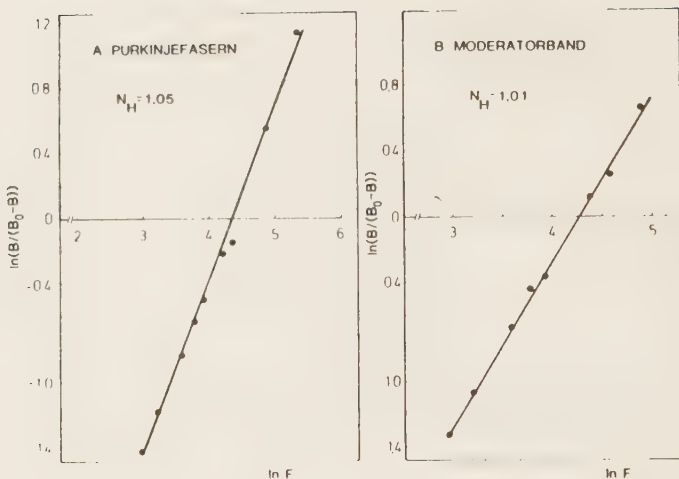


Abbildung 38:

g-Strophanthin-konzentrationsabhängige Bindung von (^3H)-g-Strophanthin an schlagende Purkinjefasern und Moderatorbandstreifen des Schafherzens
 - Auftragung nach Hill

Die Bindungsdaten aus Abbildung 36 (nach Scatchard) und 37 (nach Woolf) wurden nach der Methodik von Hill aufgetragen: ($\ln$ Ligandenkonz. gebunden/frei / $\ln$ Ligandenkonz. frei). Für Versuchsbedingungen und Kontraktionsverläufe siehe Abbildungen 30 - 33.

A: Purkinjefasern

Hill-Koeffizient, $N_H = 1.05$

$B_{\max} = 0.33 \text{ pmole/2 ml}$

Korrelationskoeffizient $R > 0.99$

B: Moderatorbandstreifen

Hill-Koeffizient, $N_H = 1.01$

$B_{\max} = 0.66 \text{ pmole/2 ml}$

Korrelationskoeffizient $R > 0.99$

- 3.4. $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in elektrisch stimulierte, schlagende Purkinjefasern und Moderatorbandstreifen
- ein Meßparameter des transmembranösen Ionentransportes

3.4.1. Vorbemerkung

In der Einführung wurde versucht die gegenwärtige Hypothese des Wirkungsmechanismus von g-Strophanthin darzulegen, derzufolge eine Hemmung der spezifischen $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase zu Veränderungen der intrazellulären Ionenzusammensetzung führt und - nach weiteren Zwischenschritten - in dem positiv inotropen Effekt resultiert.

Am schlagenden Gewebepreparat konnte einerseits eine Korrelation von (^3H) -g-Strophanthin-Bindung und positiv inotropem Effekt nachgewiesen werden, andererseits ist bereits aus den biochemischen Untersuchungen an Zellmembranen bekannt, daß g-Strophanthin die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase spezifisch hemmt.

So war es für die Fragestellung dieser Arbeit von großem Interesse nicht nur die Bindung von (^3H) -g-Strophanthin an schlagende Gewebe mit dem endgültigen Effekt des Herzglykosides - der positiven Inotropie - zu vergleichen, sondern als Zwischenglied auch die Veränderungen des Ionentransportes in diese Untersuchungen miteinzubeziehen, um dann eine eventuelle Korrelation mit den Ergebnissen aus Bindungs- und Kontraktionsversuchen nachweisen zu können.

Eine direkte Messung der spezifischen $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität im schlagenden Gewebepreparat nach Beendigung des Kontraktionsversuches mit dem optisch-kinetischen Test erwies sich aus zwei Gründen als nachteilig: Einerseits war das Gewicht des einzelnen, schlagenden Präparates relativ gering (z. B. 3.5 - 8 mg für Purkinjefasern) im Vergleich zu der im optisch-kinetischen Test benötigten Ausgangsmenge. Bei ohnehin geringer $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität in Purkinjefasern wäre damit die Grenze der Differenzierbarkeit der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase im optisch-kinetischen Test überschritten worden. Ferner hätte man, um die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase messen zu können, eine Membranpräparation durchführen, also den Zellverband des Gewebes auf-

schließen müssen. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dieser reinen in vitro-Messung auf Resultate aus den Kontraktionsversuchen wäre zumindest fraglich gewesen.

Da die Aufnahme von Kalium in die Zelle entgegen einen elektrochemischen Gradienten mittels der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase erfolgt, die teilweise durch g-Strophanthin hemmbar, d. h. glykosidspezifisch ist, bot sich als Alternative an, die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase mittelbar über Messung des transmembranösen Ionen-transportes zu untersuchen.

Das Prinzip dieser Methodik besteht darin, die Aufnahme von radioaktiven Isotopen in die Zelle zu messen. Die Verwendung von $^{42}\text{Kalium}$, einem β - und γ -Strahlung emittierenden Radionuklid, erwies sich auf Grund der kurzen Halbwertszeit (HWZ 12.5 h) als meßtechnisch zu aufwendig. So bedienten wir uns des Radioisotopes $^{86}\text{Rubidium}$ ($^{86}\text{Rb}^+$, HWZ 18.66 d), einem reinen β -Strahler, von dem bekannt ist (25, 264) und in zahlreichen Veröffentlichungen hinreichend bestätigt wurde, daß es sich im transmembranösen Ionentransport analog zu Kalium verhält (14, 35, 75, 231).

Nach der Hypothese der Reaktionskette von g-Strophanthin-Bindung und -Wirkung wäre zu erwarten, daß mit ansteigenden g-Strophanthin-Konzentrationen die spezifische Aufnahme von $^{86}\text{Rubidium}$ in schlagende Gewebe - als Maß des glykosidempfindlichen, aktiven, transmembranösen K^+ -Transportes und damit der spezifischen $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität - zunehmend gehemmt wird. Hierbei interessiert speziell an schlagenden Purkinjefasern und Moderatorbandstreifen:

- 1) ob ein spezifisch durch g-Strophanthin hemmbarer $^{86}\text{Rubidium}$ -Transport nachweisbar ist,
- 2) über welchen g-Strophanthin-Konzentrationsbereich eine solche Hemmung stattfindet,
- 3) inwieweit Unterschiede zwischen den beiden schlagenden Gewebearten nachweisbar sind,
- 4) welche Beziehung zwischen ^{86}Rb -Aufnahme einerseits und g-Strophanthin-Bindung und positiver Inotropie andererseits besteht.

3.4.2. Zeitabhängigkeit der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme

Abbildung 39 zeigt, daß sowohl in schlagenden Purkinjefasern als auch Moderatorbandstreifen die Gesamt- und die unspezifische $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in den ersten 30 Minuten der Inkubationszeit linear erfolgen.

$^{86}\text{Rb}^+$ in dieser Konzentration hat dabei keinen Einfluß auf die Kontraktionskraft. Die $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme erfolgt proportional zum Feuchtgewicht der Gewebepreparate.

Linearität bedeutet in diesem Zusammenhang, daß in der Phase der initialen $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme einerseits das Verhältnis von in die Zelle transportiertem $^{86}\text{Rb}^+$ /Zeit konstant bleibt, andererseits, daß kein für die Fragestellung relevanter $^{86}\text{Rb}^+$ -Ausstrom aus der Zelle erfolgt. Mit zunehmender Inkubationszeit - auf dieser Abbildung nicht dargestellt - kommt es zu einer allmählichen Erhöhung der intrazellulären $^{86}\text{Rb}^+$ -Konzentration und konsekutiv zu passivem bzw. eventuell auch aktivem $^{86}\text{Rb}^+$ -Ausstrom aus der Zelle. Schließlich nähern sich intra- und extrazelluläre $^{86}\text{Rb}^+$ -Konzentration einander an, bis ein Gleichgewicht von $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme und -Abnahme erreicht ist.

Für die Abbildung der zeitabhängigen $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme würde dies bedeuten, daß die anfängliche Gerade in eine Kurve abnehmender Steigung überginge, die schließlich parallel zur Zeit-Achse verlaufen würde, d. h. daß trotz Erhöhung der Inkubationszeit keine Steigerung der intrazellulären $^{86}\text{Rb}^+$ -Konzentration mehr möglich wäre.

Will man zu klaren Aussagen über die aktive $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in die Zelle - und darüber zu Aussagen über die aktive $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase, die diese Aufnahme teilweise bewirkt - gelangen, so ergibt sich aus diesem Zusammenhang die Notwendigkeit die $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in der Phase der Linearität zu bestimmen.

Deshalb wurde für die Untersuchung der g-Strophanthin-abhängigen $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in schlagende Gewebe eine Inkubationszeit von 15 Minuten gewählt.

Abbildung 39 zeigt ferner, daß zu jeder Inkubationszeit in schlagenden Moderatorbandstreifen sowohl eine größere Gesamt-, als auch größere unspezifische $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme erfolgt als in schlagenden Purkinjefasern. So beträgt die $^{86}\text{Rb}^+$ -Gesamtaufnahme/15 Minuten Inkubationszeit in schlagenden Moderatorband-

streifen 4.4 ± 0.6 nmol/mg Feuchtgewicht ($n = 6$) gegenüber 2.7 ± 0.3 nmol/mg Feuchtgewicht ($n = 6$) in schlagenden Purkinjefasern; dies entspricht einer Mehraufnahme von 40 % für Moderatorbandstreifen. Der Anteil der spezifischen, g-Strophanthin hemmbaren $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme an der $^{86}\text{Rb}^+$ -Gesamtaufnahme bleibt über die gemessene Inkubationszeit sowohl in Purkinjefasern als auch Moderatorbandstreifen mit 60 - 65 % konstant und erfolgt damit ebenfalls linear während der ersten 30 Minuten.

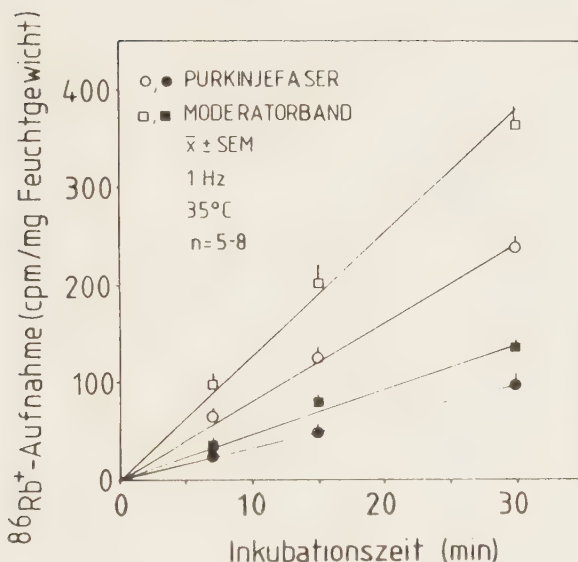


Abbildung 39:

Zeitabhängige $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in schlagende Purkinjefasern und Moderatorbandstreifen des Schafherzens

Isolierte Purkinjefasern (o, •) und Moderatorbandstreifen (□, ■) wurden in Tyrode-Lösung (75 ml; 1.8mM Ca^{2+} ; 35° C) mit Carbogen begast und elektrisch stimuliert (Frequenz 1 Hz; Dauer 5 msec, Spannung 10 - 20 % über dem Schwellenwert, ca. 3 - 5 mV).

Der Verlauf der Kontraktionskraft wurde kontinuierlich aufgezeichnet. Jedes Gewebepreparat wurde nur für eine Inkubation verwendet. Nach der Äquilibrationsphase (ca. 60 min) wurde die Purkinjefaser bzw. der Moderatorbandstreifen mit 5 $\mu\text{Ci } ^{86}\text{Rb}^+$ (ca. 1×10^7 cpm) für unterschiedliche Zeiten inkubiert und die Radioaktivität der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme anschließend gemessen.

Feuchtgewicht:

5.52 ± 0.40 mg ($\bar{x} \pm \text{sem}$); n = 36 (Purkinjefaser) bzw.

6.02 ± 0.44 mg ($\bar{x} \pm \text{sem}$); n = 39 (Moderatorbandstreifen).

Jeder Kurvenpunkt ergibt sich aus dem Mittelwert, $\bar{x} \pm \text{sem}$, aus 5 - 8 Einzelmessungen.

Die offenen Symbole (o, □) markieren die $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme ohne g-Strophanthin ($\bar{x}$ Gesamtaufnahme), die ausgefüllten Symbole (•, ■) die $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme, die noch nach dem Eintritt der Toxizität bei 1×10^{-4} M g-Strophanthin gemessen werden konnte (= unspezifische Aufnahme).

3.4.3. g-Strophanthin-konzentrationsabhängige $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme

In Abbildung 39 konnte gezeigt werden, daß sowohl in schlagenden Purkinjefasern als auch Moderatorbandstreifen des Schafherzens ein ähnlich großer Prozentsatz (60 - 65 %) der gesamten $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in die Zelle durch g-Strophanthin hemmbar, d. h. glykosidspezifisch, ist.

Es lag nun nahe zu untersuchen, über welchen g-Strophanthin-Konzentrationsbereich diese Hemmung erfolgt, in welcher Beziehung diese Hemmung zum positiv inotropen Effekt von g-Strophanthin steht und ob sich Unterschiede innerhalb der verschiedenen Gewebearten feststellen lassen.

Für diese Untersuchungsreihe wurden analog zu 3.3.2. schlagende Purkinjefasern und Moderatorbandstreifen mit ansteigenden Konzentrationen g-Strophanthin inkubiert. Nach Eintreten des maximalen Glykosideffektes, der einerseits aus den aktuellen, fortlaufenden Kontraktionskraftaufzeichnungen bestimmt, andererseits aus den vorangegangenen Studien zur Konzentrations- und zeitabhängigen Kontraktionskraftzunahme entnommen wurde (vgl. besonders Abbildung 35), wurden die schlagenden Gewebe mit ca. 5 $\mu\text{Ci } ^{86}\text{RbCl}$ (ca. 1×10^7 cpm) inkubiert.

Auf Grund der in diesem Zeitbereich gezeigten Linearität der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme wurde für alle g-Strophanthin-Konzentrationen eine Inkubationszeit von 15 Minuten gewählt. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abbildung 40 zusammengefaßt:

g-Strophanthin führt in beiden schlagenden Gewebearten innerhalb des gleichen Konzentrationsbereiches zu einer Hemmung der spezifischen $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme. Diese Hemmung beginnt bei ca. $5 \times 10^{-8}\text{M}$ g-Strophanthin und ist bei ca. $1 \times 10^{-6}\text{M}$ vollständig eingetreten. In beiden schlagenden Geweben wird eine 50 %-Hemmung der glykosidspezifischen $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme bei ca. $3 \times 10^{-7}\text{M}$ g-Strophanthin erreicht.

Bereits ein erster Vergleich mit den Kontraktionskraftzunahmen bei analogen g-Strophanthin-Konzentrationen - eine ausführliche Bewertung der Ergebnisse wird noch folgen müssen - zeigt, daß die Hemmung des transmembranösen $^{86}\text{Rb}^+$ -Transportes über denselben Konzentrationsbereich erfolgt, der auch den positiv

inotropen Effekt verursacht und daß bei ca. $3 \times 10^{-7} \text{ M}$ g-Strophanthin eine halbmaximale Hemmung des $^{86}\text{Rb}^+$ -Transportes mit dem maximalen, positiv inotropen Effekt ohne deutliche Zeichen von Toxizität korreliert.

Zudem konnte bereits früher aufgezeigt werden, daß $3 \times 10^{-7} \text{ M}$ g-Strophanthin in beiden Gewebearten der Dissoziationskonstanten entspricht, d. h. daß bei $3 \times 10^{-7} \text{ M}$ auch 50 % der zur Verfügung stehenden Bindungsstellen besetzt sind.

Auch in dieser Versuchsreihe zur Messung der Auswirkungen von g-Strophanthin auf den glykosidspezifischen Ionentransport zeigten sich keine signifikanten, qualitativen Unterschiede in der Glykosidempfindlichkeit von schlagenden Purkinjefasern und Moderatorbandstreifen.

Abbildung 40 verdeutlicht noch einmal den in Abbildung 39 bereits erkennbaren Befund, daß schlagende Purkinjefasern sowohl insgesamt als auch glykosidspezifisch um ca. 40 % weniger $^{86}\text{Rb}^+$ pro mg Feuchtgewicht aufnehmen als schlagende Moderatorbandstreifen.

Dieser signifikante, quantitative Unterschied im Ionentransport korreliert mit der erniedrigten Anzahl an spezifischen Bindungsstellen, die in schlagenden Purkinjefasern nachgewiesen werden konnten.

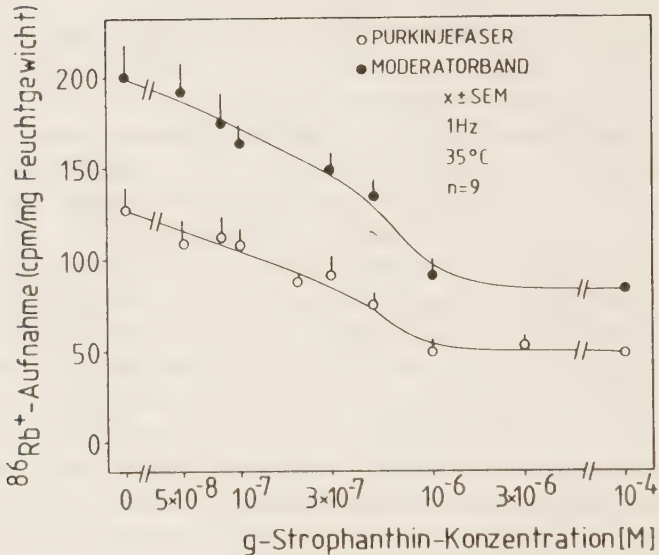


Abbildung 40:

g-Strophanthin-konzentrationsabhängige Hemmung der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in schlagende Purkinjefasern und Moderatorbandstreifen des Schafherzens

Isolierte Purkinjefasern und Moderatorbandstreifen wurden in Krebs-Henseleit-Lösung (75 ml; 1.8mM Ca^{2+} ; 35° C) mit Carbogen begast und elektrisch stimuliert (Frequenz 1 Hz; Dauer 5 msec, Spannung 10 - 20 % über dem Schwellenwert, ca. 5 - 15 V). Der Verlauf der Kontraktionskraft wurde kontinuierlich aufgezeichnet. Jedes Gewebepreparat wurde nur für eine g-Strophanthin-Konzentration verwendet. Nach Ablauf der Äquilibrationszeit (ca. 60 min) wurden jeweils unterschiedliche g-Strophanthin-Konzentrationen zugegeben und nach Erreichen des maximalen, positiv inotropen Effektes der jeweiligen g-Strophanthin-Konzentration die $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme über 15 min gemessen (5 μCi $^{86}\text{RbCl}$, ca. 1×10^7 cpm Gesamtradioaktivität in 75 ml Inkubationsmedium).

Spezifische ^{86}Rb -Aufnahme:

2.7 nmol/mg Feuchtwicht/15 min in schlagende Purkinjefasern bzw.

4.4 nmol/mg Feuchtwicht/15 min in schlagende Moderatorbandstreifen.

Feuchtwicht:

5.72 ± 0.24 mg (Purkinjefaser; $\bar{x} \pm \text{sem}$; n = 60) bzw.

8.17 ± 0.45 mg (Moderatorbandstreifen; $\bar{x} \pm \text{sem}$; n = 53).

Jeder Wertepunkt ergibt sich als Mittelwert, $\bar{x} \pm \text{sem}$, aus 5 - 9 Einzelmessungen. Zur Kontraktionskraft bei ansteigenden g-Strophanthin-Konzentrationen siehe Abbildungen 30 - 36.

3.5. Einfluß von L-Propranolol auf die g-Strophanthin-Wirkung an schlagenden Purkinjefasern

In den bisherigen Untersuchungen konnte sowohl an schlagenden Purkinjefasern als auch Moderatorbandstreifen eine strenge Korrelation von (^3H)-g-Strophanthin-Bindung, positiv inotropem Effekt und Hemmung der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme innerhalb des gemessenen g-Strophanthin-Konzentrationsbereiches gefunden werden.

Eine Dissoziation dieser 3 Komponenten oder ein entgegengesetzter Effekt von g-Strophanthin auf einen dieser Faktoren würde bedeuten, daß der Wirkungsmechanismus von g-Strophanthin nicht ausschließlich mit einer Hemmung der spezifischen ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase erklärt werden könnte.

Eine solche Dissoziation wurde von verschiedenen Autoren berichtet (182, 186, 204).

Speziell bei vergleichsweise niedrigen Konzentrationen wurde die g-Strophanthin-Wirkung auf Inotropie und Ionentransport auf die Wirkung an endogenen Neurotransmittern zurückgeführt und dabei ein indirekter, β -adrenerger Effekt postuliert (Lechat et al., 158).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von niedrigen g-Strophanthin-Konzentrationen in der Kombination mit dem β -Rezeptor-blockierenden L-Propranolol auf das Reizleitungssystem des Schafherzens untersucht, indem schlagende Purkinjefasern ($n = 9$, Feuchtgewicht: 6.3 ± 0.46 mg; Ausgangskraft: 44 ± 8.1 mN) mit 1×10^{-6} M L-Propranolol inkubiert (30 min) und dann 5×10^{-8} M g-Strophanthin (120) min zugegeben wurde. Die Messung der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme erfolgte analog zu 3.4.2.

Erwartungsgemäß hat L-Propranolol alleine einen negativ inotropen Effekt zur Folge (Reduzierung der Kontraktionskraft um 56 ± 6.0 % der Ausgangskraft gegenüber 12 ± 3.2 % ohne L-Propranolol). Diese Wirkung wird durch zusätzliche Gabe von 5×10^{-8} M g-Strophanthin nicht nur aufgehoben, sondern g-Strophanthin entfaltet einen positiv inotropen Effekt, der in seinem Ausprägungsgrad von L-Propranolol unbeeinflusst bleibt (Erhöhung der Kontraktionskraft um 47 ± 20 % des Ausgangswertes nach vorangegangenen L-Propranolol gegenüber 39 ± 15 % mit g-Strophanthin alleine).

Die Hemmung der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme durch $5 \times 10^{-8}\text{M}$ g-Strophanthin erfolgt in Gegenwart von L-Propranolol ebenfalls ohne statistisch signifikanten Unterschied [116 ± 12.0 cpm/mg Feuchtgewicht/15 min (L-Propranolol + g-Strophanthin) gegenüber 108 ± 11.1 (g-Strophanthin)], sodaß diese Untersuchungen keinen Hinweis auf die Beteiligung eines β -adrenerg-gekoppelten Mechanismus an der Wirkungsweise von g-Strophanthin an schlagenden Purkinjefasern ergeben.

4. DISKUSSION

4.1. Der Herzglykosidrezeptor des Schafherzens

Vor der Zuwendung zu dem Problem möglicher Unterschiede in Glykosid-Bindungsverhalten und Glykosid-Wirkung zwischen Reizleitungssystem und Myokard mußte versucht werden, die Glykosid-Bindung als solche so exakt wie möglich zu charakterisieren, um eventuell auch am Schafherzen die Existenz eines spezifischen Glykosidrezeptors aufzeigen zu können.

Hierfür wurden isolierte Muskelzellmembranpräparationen gewählt, die die Vorteile der selektiven Anreicherung, des befriedigenden Reinheitsgrades und damit der größeren, glykosidspezifischen ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität pro Meßeinheit besitzen.

Dem stehen die Nachteile von nur begrenzt berechenbaren Artefakten durch die Selektionsmaßnahmen und die deshalb nur beschränkt mögliche Übertragbarkeit auf die Verhältnisse in vivo gegenüber, da zum Beispiel isolierte Zellmembranen keine Ionenkonzentrationsgradienten mehr - wie intakte Zellen - trennen. Es gilt ferner zu berücksichtigen, daß isolierte Zellmembranen unter anderem auch mit Desoxycholat (0.5 %) aufbereitet worden waren, von dem bekannt ist, daß es zu einer Veränderung des g-Strophanthin-Bindungsverhaltens und der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität führen kann (43, 240).

Andererseits stellt die Messung an isolierten Zellmembranen bis heute das einzig verfügbare Verfahren dar, die ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität direkt zu messen, da das Aktivitätszentrum des Enzyms in das Zellinnere gerichtet ist (147, 148) und deshalb an intakten Zellen nur indirekt, über Messung von Ionenströmen (entweder unter Verwendung von radioaktivem $^{42}\text{K}^+$ bzw. $^{86}\text{Rb}^+$ oder mittels ionenselektiver Mikroelektroden) Auskunft über eine ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität zu erhalten ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb mehrere Verfahren kombiniert (Präparation von isolierten Zellmembranen, Gewebemomogenaten, elektrisch gereizten, schlagenden Geweben) in der Hoffnung, die jeweiligen Vorteile addieren und methodisch bedingte Abweichungen zumindest als solche erkennen zu können.

An isolierten Zellmembranen des Schafmyokards konnten wir einen Rezeptor nachweisen, der g-Strophanthin

- selektiv
- sättigbar
- zeit- und temperaturabhängig (Abbildungen 5 -6)
- konzentrationsabhängig (Abbildung 7)

und - reversibel (Abbildung 6)

bindet.

Die Reversibilität der Glykosidbindung wurde im Laufe der Jahre unterschiedlich beurteilt, wobei die Meinungen von leicht reversibel (20, 175, 243) über schwer reversibel (17, 221) bis zu irreversibel (3, 265) reichten.

Mit einer Gleichgewichtskonstanten ($K_D = 1.9 \times 10^{-9} M$) und kinetischen Konstanten ($k_{+1} = 1.2 \times 10^5 M^{-1} sec^{-1}$; $k_{-1} = 1.3 \times 10^{-4} sec^{-1}$; $37^\circ C$), die - geringfügig höher - im Bereich der Affinität des menschlichen Herzens liegen ($K_D = 3.7 \times 10^{-9} M$, $k_{+1} = 1.2 \times 10^5 M^{-1} sec^{-1}$; $k_{-1} = 2.3 \times 10^{-4} sec^{-1}$; $37^\circ C$), ist das Schaf den "digitalisempfindlichen" Arten zuzuordnen [z. B. Rind ($K_D = 2.7 \times 10^{-9} M$), Katze ($K_D = 4.2 \times 10^{-9} M$) oder Hund ($K_D = 4.3 \times 10^{-9} M$) {58, 64}].

Dieser Befund stimmt mit der von Erdmann et al. bestimmten Dissoziationskonstanten des Schafherzens von $K_D = 1.1 \times 10^{-9} M$ (76) überein.

Das vielfach als modellhaft angesehene und in zahlreichen Glykosidstudien verwendete Meerschweinchen ($K_D = 1.1 \times 10^{-7} M$) ist demgegenüber um den Faktor 50 - 100 glykosidunempfindlicher als das Menschen- oder Schafherz (38).

Die Bindung von g-Strophanthin an Zellmembranen des Schafherzens erfolgt mit hoher Affinität an eine einzige Bindungsstellenart. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß sich in keiner einzigen, der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchsreihen, Evidenz für die Existenz einer zweiten Rezeptorgattung im Schafherzgewebe erbringen ließ.

Diese Versuche beinhalteten die konzentrationsabhängige (3H)-g-Strophanthin-Bindung und die Bestimmung von Affinität und Anzahl der Bindungsstellen:

- unter Verwendung verschiedener Auswerteverfahren: nach den Methoden von Scatchard (Abbildung 7), Woolf (Abbildung 8) und Hill (Abbildung 9)
- unter Änderung des Bindungsmilieus: sowohl durch Verwendung eines Mg^{2+} , ATP und Na^+ -haltigen Inkubationsmediums statt eines Mg^{2+} und P_i -haltigen als auch bei der Untersuchung des Einflusses verschiedener Kaliumkonzentrationen
- unter Verwendung von 14 chemisch-struktural verschiedenen Herzglykosiden, die um den Faktor 10^3 in der Wirkstärke differierten
- an Gewebehomogenaten aus linkem und rechtem Ventrikelmyokard, aus Moderatorband und Purkinjefasern
- an elektrisch stimulierten, schlagenden Moderatorbandstreifen und Purkinjefasern.

Als einziger Hinweis fiel jedoch auf, daß die in vitro-Effekte an isolierten Zellmembranen [die Hemmung der $(Na^+ + K^+)$ -ATPase] bei Glykosidkonzentrationen gemessen wurden, die etwa 100 Mal niedriger sind als diejenigen, die benötigt wurden, um an schlagenden Geweben des Schafherzens eine positiv inotrope Wirkung bzw. Hemmung des $^{86}Rb^+$ -Transportes hervorzurufen.

Damit korrelieren die unterschiedlichen (^3H) -g-Strophanthin-Dissoziationskonstanten isolierter Zellmembranen ($K_D = 1.9 \times 10^{-9} M$) bzw. der verschiedenen Gewebehomogenate ($K_D = 1.9 - 3.6 \times 10^{-9} M$) gegenüber elektrisch stimulierten Moderatorbandstreifen ($K_D = 2.5 \times 10^{-7} M$) bzw. Purkinjefasern ($K_D = 3.4 \times 10^{-7} M$). Dies muß den Verdacht auf die Existenz von zwei Rezeptorenarten lenken: An der digitalisunempfindlichen Ratte konnte die Existenz von zwei Rezeptoren nachgewiesen werden (75, 81, 103, 104).

Bei schlagenden Ventrikelstreifen der Ratte, an denen gleichzeitig die positiv inotropen Effekte und die (^3H) -g-Strophanthin-Bindung oder der aktive $^{86}Rb^+$ -Transport gemessen werden kann, scheint der hochaffine Rezeptor ($K_{D1} = 1.0 \times 10^{-7} M$) mit geringer Bindungskapazität (ca. 15 %) mit der positiv inotropen Wirkung, der niedrigaffine Rezeptor ($K_{D2} = 2.8 \times 10^{-5} M$) mit hoher Bindungskapazität (ca. 85 %) mit dem aktiven $^{86}Rb^+$ -

Transport bzw. an isolierten Zellmembranen mit der Hemmung der spezifischen ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase korreliert zu sein (56, 77, 82).

An separat kultivierten Herzmuskelzellen der Ratte zeigten Werdan et al. (260, 261), daß es sich tatsächlich um zwei verschiedene Rezeptoren des Herzmuskels handelt und nicht etwa um Rezeptoren anderer Zellen, wie zum Beispiel Fibroblasten oder Nervenendigungen, die ebenfalls an intaktem Herzgewebe zu finden sind. Am Meerschweinchenherzen konnte ebenfalls über eine Dissoziation von Glykosidbindung/Inotroper Wirkung zu Inotroper Wirkung/Hemmung des $^{86}\text{Rb}^+$ -Transportes am schlagenden linken Vorhof eine zweite Rezeptorenart definiert werden (34, 37, 91, 93).

Zwei verschiedene g-Strophanthin-Bindungsstellen konnten auch an isolierten Herzmuskelzellmembranen des Menschen und der Katze demonstriert werden, die in einem Kalium-haltigen Medium inkubiert waren - die physiologische Relevanz dieser unter solchen Bedingungen gemessenen, unterschiedlichen Bindungsstellenarten ist bisher indessen nicht geklärt (35, 81).

Wie in den vorliegenden Untersuchungen am Schafherzen, so können bei den digitalissensitiven Spezies Katze und Mensch an Papillarmuskeln positiv inotrope Effekte nur bei Glykosidkonzentrationen von ungefähr 10^{-7}M ausgelöst werden (81, 178).

Dem steht gegenüber, daß sich am Patienten die Serum-Glykosidspiegel in vivo im nanomolaren Bereich bewegen und auch die Dissoziationskonstante und IC_{50} der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Hemmung an isolierten Zellmembranen des menschlichen Herzens im 10^{-9}M g-Strophanthin-Konzentrationsbereich liegen.

Auch wenn man entweder das biochemische Modell von Repke und Schönfeld (201) in Betracht zieht, demzufolge nicht verschiedene Rezeptorenarten, sondern 1 Rezeptor mit unterschiedlichen Konformationsmöglichkeiten Ursache der divergierenden Befunde ist, oder aber der These folgt, daß Herzglykoside im nanomolaren Bereich indirekt, durch Freisetzung von Katecholaminen wirken (1, 158; dieses wird noch zu diskutieren sein) - so gibt es dennoch gegenwärtig keine ausreichende Erklärung für die niedrigen Digitalisspiegel in vivo einerseits und den hohen Konzentrationen andererseits, die notwendig sind, um

eine positiv inotrope Wirkung in den digitalisempfindlichen Spezies Mensch, Katze, Hund und Schaf zu produzieren (82).

Die unterschiedlichen Dissoziationskonstanten am Schafherzen in dieser Arbeit könnten jedoch auch das Resultat der unterschiedlichen Versuchsbedingungen und Präparationen sein:

So findet die (^3H)-g-Strophanthin-Bindung an schlagende Gewebestreifen in einer Krebs-Henseleit-Lösung statt, die auch die Ionen Na^+ , Ca^+ und K^+ enthält, von denen bekannt ist, daß sie das Bindungsverhalten beeinflussen können (11, 121), während die Bindung an Gewebehomogenate bzw. an isolierte Zellmembranen durch ein Mg^{2+} und P_i -haltiges Inkubationsmedium optimiert wurde. Bei diesen Präparationen wurden ferner die Zellen aufgebrochen, d. h. es bestand kein Ionenkonzentrationsgradient mehr, gegen den die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPasen wie im intakten, schlagenden Gewebe arbeiteten.

Auf Grund dieser Überlegungen und auch auf Grund der Tatsache, daß kein Anhalt für eine Dissoziation von Glykosidbindung und den pharmakologischen Effekten positive Inotropie, Hemmung des ^{86}Rb -Transportes und Toxizität am Schafherzen gefunden werden konnte - wie hingegen in Ratte und Meerschweinchen erwiesen - darf davon ausgegangen werden, daß die Existenz einer zweiten Rezeptorenart als Erklärung der verschiedenen Präparationsaffinitäten zu g-Strophanthin eher unwahrscheinlich ist.

Sollten weitere Untersuchungen tatsächlich zwei unterschiedliche Rezeptoren am Schafherzen aufzeigen, so konnte im Rahmen dieser Arbeit zumindest kein Unterschied zwischen Reizleitungssystem und Myokard festgestellt werden.

Um eine spezifische Bindungsstelle Rezeptor nennen zu können, muß definitionsgemäß (229) der Nachweis eines biologischen Effektes, der direkt auf die spezifische Bindung rückführbar ist, erbracht werden.

Im Falle des Herzglykosidrezeptors geht dieser Nachweis auf Beobachtungen von Skou (226), der ein ATP-spaltendes Enzym entdeckte, daß außer Mg^{2+} noch K^+ und Na^+ zu seiner Aktivierung benötigte, und auf Ergebnisse von Schatzmann zurück (216), der an Erythrozyten ein durch Herzglykoside spezifisch hemmbares Na^+/K^+ -Transportsystem beschrieb.

Dies hatte intensive Untersuchungen einer möglichen Korrelation der Glykosidbindung mit der Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase zur Folge:

So sprachen bereits Repke und Portius 1963 (199) von dem "Digitalis-Rezeptor-Enzym". 1971 konnten Allen et al. (8) an Hundenierenpräparationen eine solche Korrelation nachweisen; wenig später wurde in verschiedenen Präparationen eine Korrelation der Zahl der Glykosidrezeptoren einerseits mit der Zahl der ATPase-Moleküle (125, 128, 147, 153), andererseits auch mit der Zahl der Nukleotidbindungsstellen (70) gefunden. Das stöchiometrische Verhältnis zwischen Glykosidbindungsstelle und Nukleotidbindung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase von 1:1 unterstützte die - bereits in 1.2 erwähnte - Auffassung von einem, die Zellmembran durchspannenden Protein, das auf der Innenseite der Membran das aktive Zentrum der ATPase und auf der Außenseite die Glykosidbindungsstelle aufweist (148).

Konnten zwar viele Studien Evidenz für diese Hypothese erbringen (10, 32, 67, 70, 71, 101), so blieb sie keinesfalls unwidersprochen: Es wurde von einer Dissoziation der inhibitorischen Wirkung und dem positiv inotropen Glykosideffekt berichtet (182, 185, 186, 188, 242), von einer Aktivierung des ATPase-Enzyms bei niedrigen Glykosidkonzentrationen (161, 188, 200) und - in elektrophysiologischen Studien - von einer Stimulation des transmembranösen Ionentransportes bei ebenfalls niedrigen, aber positiv inotrop wirkenden Konzentrationen (45, 46, 59, 92).

Es darf jedoch nicht übersehen werden, daß die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität direkt bisher ausschließlich in Membranpräparationen und nicht in intaktem Gewebe ermittelt werden kann - so basieren zum Beispiel auch elektrophysiologische Untersuchungen in der Regel auf der Messung von Ionenströmen. Erdmann et al. konnten an zahlreichen Studien mit dieser direkten Methodik an Zellmembranen glykosidempfindlicher Spezies - Mensch, Rind, Hund und Katze - eine enge Korrelation von Glykosidbindungsstellenbesetzung und $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Hemmung aufzeigen (36, 77, 80), während eine Dissoziation dieser Parameter in den relativ digitalisunempfindlichen Tierarten Meerschweinchen und Ratte nachweisbar war (35, 75).

An isolierten Zellmembranen des Schafherzens korreliert in dieser Arbeit (Abbildung 12) ebenfalls die (^3H)-g-Strophanthin-Bindung mit der Hemmung der glykosidspezifischen ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität. Eine Korrelation besteht dabei nicht nur in derjenigen (^3H)-g-Strophanthin-Konzentration, die zu 50 % Bindungsstellenbesetzung und 50 % Hemmung der Enzymaktivität führt (Abbildung 12), vielmehr läßt sie sich über den gesamten (^3H)-g-Strophanthin-Bindungsbereich verfolgen. Mit diesem Experiment kann die Existenz eines glykosidspezifischen Rezeptors in isolierten Zellmembranen des Schafmyokards als bewiesen gelten.

4.2. Die Glykosid-Rezeptor-Bindungsreaktion

Die chemische Reaktion der Glykosid-Rezeptor-Bindung läßt sich durch die thermodynamischen Parameter Freie Energie (ΔG), Enthalpie (ΔH), und Entropie (ΔS) beschreiben.

Diese Größen resultieren letztlich aus den kinetischen Konstanten und deren Temperaturabhängigkeit (Tabelle 3): Eine Erniedrigung der Inkubationstemperatur führt zwar sowohl in der Glykosid-Assoziation [$k_{+1} = 1.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ (37° C) auf 7.2×10^3 (10° C)] als auch in der Komplex-Dissoziation [k_{-1} von $1.3 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ (37° C) auf 1.5×10^{-6} (10° C)] zu einer Verlangsamung der Reaktion, da sich jedoch diese stärker auf die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante, k_{-1} , auswirkt, ändert sich auch die Affinitätskonstante, K_A , aus deren Graphen in der Auftragung nach van't Hoff sich die Änderung der Enthalpie, ΔH , errechnen läßt.

Im Falle der g-Strophanthin-Bindung an isolierte Zellmembranen des Schafherzens handelt es sich - nach Ablauf der Reaktion - prinzipiell um einen exergonen Prozeß:

Die Freie Energie, ΔG° - also der Teil an Energie, der bei optimaler Ausnutzung in Arbeit umgesetzt werden könnte - beträgt $12.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ und wird durch Erniedrigung der Temperatur (bis 10° C) nur gering beeinflusst (Tabelle 5).

Bei der Glykosidbindungsreaktion wird mit $15.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ (37° C , Enthalpie, ΔH°) relativ viel Wärme frei und dabei der

"Ordnungsgrad" des Systems erniedrigt (Entropie, $\Delta S^\circ = -9.7$ cal mol⁻¹ deg⁻¹; 37 °C).

Zur Initiierung der Reaktion wird jedoch Energie benötigt, die der Energiebarriere entspricht, mit der sich ein System der Änderung seines status quo "widersetzt" (Tabelle 5, Abbildung 11).

Die Glykosid-Bindungsreaktion und ihre thermodynamischen Parameter sind speziesabhängig:

Tabelle 6 zeigt, daß besonders bei den Faktoren Freie Energie, ΔG , und Enthalpie, ΔH , zwischen den Arten Schaf und Mensch Ähnlichkeiten bestehen.

Bereits bei der Darlegung der Resultate fiel auf, daß der bei 10° C ermittelte Wert der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten, k_{-1} , in der Auftragung nach Arrhenius (Abbildung 10) nicht auf der Verbindungsgeraden der übrigen Wertepunkte lag. Verbindet man den abweichenden k_{-1} -Wert mit den übrigen Punkten, so ergibt sich ein "Knick" in der Temperaturabhängigkeit bei ca. 20° C.

Angesichts der Schwierigkeit einer exakten Bestimmung der kinetischen Konstanten in diesem Temperaturbereich wird zwar auf eine abschließende Wertung des Ergebnisses verzichtet, jedoch soll die damit verbundene Problematik zumindest angesprochen werden:

Verschiedene Autoren berichteten von einer veränderten Temperaturabhängigkeit der (Na⁺+K⁺)-ATPase-Aktivität und des Glykosidbindungsverhaltens bei ca. 20° C.

So wiesen Post, Sen et al. (195) und Schwartz et al. (219) eine deutliche, sprunghafte Änderung der Aktivierungsenergie für die (Na⁺+K⁺)-ATPase-Reaktion bei dieser Temperatur nach, während andere Gruppen von einem veränderten g-Strophanthin-Bindungsverhalten zwischen 15° und 29° C an unterschiedlichen Organen berichteten (42, 71, 238, 251).

Konnte auch Philipp (190) an Meerschweinchen- und Rattenhirnzellmembranen ebenfalls an der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten, k_{-1} , die Abweichung feststellen, so gilt für die Mehrzahl der Befunde, daß sie an der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten, k_{+1} , erhoben wurden.

Die Erklärungsversuche setzen überwiegend an den morphologisch-biochemischen Strukturverhältnissen der Zellmembran an: Die Zellmembran besteht aus einer Lipid-Doppelschicht mit nach innen ausgerichteten, hydrophoben Kohlenwasserstoffketten, die sich in einem reversiblen Fließgleichgewicht zwischen flüssiger und gelartiger Zustandsform befinden, das großen Einfluß auf die Lipid-Dynamik hat. Die physikalischen Eigenschaften der Lipide können wiederum in Interaktion mit Proteinen die Aktivität membrangebundener Enzyme - wie der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase - beeinflussen (41, 108, 142).

Phasenverschiebungen bzw. -übergänge in der Membranamatrix im Bereich einer kritischen Temperatur könnten demnach den abrupten Wechsel der Aktivierungsenergie der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Reaktion und das veränderte g-Strophanthin-Bindungsverhalten bei 20° C erklären (108, 239).

4.3. Vergleich von Reizleitungssystem und Ventrikelmyokard

4.3.1. Das Gewebehomogenat

Nachdem die Grundlagen zur Charakterisierung der (^3H) -g-Strophanthin-Bindungsreaktion an isolierten Zellmembranen des Ventrikel-Myokards erarbeitet worden waren, war es nun erlaubt, die (^3H) -g-Strophanthin-Bindung an unterschiedlichen Teilen des Herzens zu untersuchen.

Aus den bereits in dem Kapitel "Resultate" dargelegten Gründen wurden hierfür nicht isolierte Zellmembranen sondern Zellhomogenate gewählt, in denen nur eine Aufschließung und Separierung des Zellverbandes mittels mechanischer Zerkleinerung und Zentrifugation erfolgt war. Als Herzteile fanden für das Arbeitsmyokard Gewebe vom linken und rechten Ventrikel und das Moderatorband, für das spezialisierte Reizleitungssystem frei verlaufende Purkinjefasern aus beiden Ventrikeln (überwiegend jedoch aus dem linken) Verwendung.

War erwartungsgemäß die Ausbeute an glykosidspezifisch hemmbarer $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase geringer als in isolierten Zellmembranen

[ca. 12 nmol ATP hydrolysiert/min/mg Protein (Homogenat) bzw. 250 nmol (Zellmembranen), 37° C, linkes Ventrikelm yokard], so erfolgte die Bindung noch immer sehr spezifisch (> 99.9 %).

Es konnte nachgewiesen werden, daß die (³H)-g-Strophanthin-Bindung in allen untersuchten Zellhomogenaten an einen einzigen Rezeptor spezifisch, sättigbar, reversibel und zeit- und konzentrationsabhängig bindet (Abbildung 13 - 19).

Sowohl die kinetischen Konstanten, k_{+1} und k_{-1} , als auch die Gleichgewichtskonstanten, K_D , befinden sich in jeweils übereinstimmenden Konzentrationsbereichen (vgl. Tabelle 7), ohne daß zwischen spezialisiertem Reizleitungssystem einerseits und Arbeitsmyokard andererseits oder aber innerhalb der verschiedenen Bereiche des Myokards signifikante Unterschiede nachweisbar gewesen wären.

Aus den (³H)-g-Strophanthin-Bindungsdaten an Zellhomogenaten läßt sich die Anzahl der Bindungsstellen berechnen:

Das Arbeitsmyokard besitzt mit ca. 1×10^{14} Rezeptoren pro Gramm Feuchtgewicht [1.3×10^{14} (linker Ventrikel), 0.86×10^{14} (rechter Ventrikel), 1.1×10^{14} (Moderatorband)] ähnlich viele Bindungsstellen wie das menschliche Myokard (80).

Demgegenüber ist die Anzahl in Purkinjefasern mit 0.33×10^{14} deutlich niedriger.

Die geringe Anzahl an Bindungsstellen pro Gramm Feuchtgewicht bedeutet jedoch auch eine geringere Anzahl pro Zelle, da sowohl Purkinjefaserzellen als auch Myokardzellen vergleichbare Oberflächen besitzen [Purkinjefaserzelle: Länge 20 - 60 µm, Durchmesser 10 - 30 µm; Myokardzelle: Länge 30 - 60 µm, Durchmesser 10 - 15 µm; (31,130)].

Dieser Befund korrespondiert mit der ebenfalls reduzierten, spezifischen ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität in Purkinjefasern gegenüber dem Myokard [2.5 nmol ATP hydr./min/mg Protein (Purkinjefaser) bzw. 12 - 21 nmol (Myokard)].

Aus dieser ersten Gegenüberstellung funktional verschiedener cardialer Gewebe des Schafherzens bleibt festzuhalten, daß sich kein qualitativer aber sehr wohl ein quantitativer Unterschied insofern nachweisen läßt, als an Zellhomogenaten Purkinjefasern weniger Glykosidrezeptoren als das Arbeitsmyokard besitzen.

Bevor diese Befunde mit den Ergebnissen der (^3H)-g-Strophanthin-Bindung und ihren pharmakologischen Wirkungen an schlagnenden Gewebepräparationen verglichen und bevor diese Untersuchungen in den Kontext der von anderen Forschungsgruppen bisher veröffentlichten Resultate gestellt werden, seien an dieser Stelle zwei Versuchsreihen besprochen, die versuchten die qualitative Glykosidempfindlichkeit der unterschiedlichen Gewebearten des Schafherzens durch Änderung der Versuchsbedingungen noch exakter definieren zu können.

4.3.1.1. Der Kalium-Effekt

Bei der Frage nach eventuellen Unterschieden zwischen Reizleitungssystem und Myokard in Bezug auf die Glykosidbindung ist es nicht nur von Wichtigkeit das Bindungsverhalten per se zu untersuchen - vielmehr besteht durchaus die Möglichkeit, daß verschiedene Gewebearten des Herzens auch auf Änderungen des Bindungsmilieus mit unterschiedlichem Bindungsverhalten reagieren.

Hierbei ist auf Grund seiner praktischen Bedeutung in der Induktion, Prävention und Therapie von Glykosidintoxikationen die Änderung der Kaliumkonzentration im Blutserum von Bedeutung. An isolierten Zellmembranen und Zellhomogenaten des linken Ventrikels, sowie an Zellhomogenaten aus Moderatorband und Purkinjefasern des Schafherzens konnte gezeigt werden, daß eine Erhöhung der Kalium-Konzentration im Inkubationsmedium (0 - 5mM) zu einer Verringerung der (^3H)-g-Strophanthin-Bindung führt, die auf einer Abnahme der Affinität des Glykosidrezeptors beruht (Abbildung 20 - 24). Die Zahl der für die Glykosidbindung zur Verfügung stehenden Rezeptoren wird durch Kalium nicht beeinflusst.

Diese Änderung der Affinität beruht vornehmlich auf einer Abnahme der Rate der Assoziationen, während sich die Rate der Dissoziationen nicht ändert (Abbildung 25).

Die Auswertung der Ergebnisse nach der Methode von Lineweaver und Burk zeigte, daß der Kaliumeffekt auf einer kompetitiven Verdrängung von g-Strophanthin beruht (Abbildung 26).

Die Versuche ergaben dabei im untersuchten Kaliumkonzentrationsbereich weder bezüglich des Auftretens des Effektes noch dessen Ausprägungsgrades einen Hinweis auf Unterschiede zwischen der Reaktion von Purkinjefasern und Arbeitsmyokard des Schafherzens.

Die publizierten Arbeiten, die sich mit diesem Problem befaßt haben, bestätigen im Wesentlichen die vorliegenden Ergebnisse: So beobachteten Akera und Brody (9) und Erdmann et al. (70) an isolierten Zellmembranen des menschlichen Herzmuskels, daß Kalium unter Inkubationsbedingungen, die sich physiologischen Zuständen annäherten, vor allem die Assoziations- und nicht die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante beeinflusst. Bereits 1970 hatten Allen und Schwartz (7) von einer erniedrigten Glykosidaffinität bei Kalium gesprochen und dies mit einer Konformationsänderung des Glykosidrezeptors durch Kalium erklärt. Weitere Untersuchungen konnten dies bestätigen (13, 65, 70, 115, 262).

An Purkinjefasern des Hundeherzens fand Anderson (15) bei Erhöhung der Kaliumkonzentration eine Dissoziation von bereits gebundenem (^3H)-g-Strophanthin und damit einhergehend eine Aufhebung der Glykosidintoxikation.

Im selben Jahr beschrieben Wallick und Schwartz den Mechanismus zwischen Kalium und g-Strophanthin als kompetitive Verdrängung (252); 1976 veröffentlichten Han et al. (113), daß die für Kalium beschriebene Wirkung für alle Alkalimetalle nachweisbar ist.

Dabei gilt für die Wirkintensität: $\text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Li}^+$.

4.3.1.2. Wirkung unterschiedlicher Herzglykoside

In dem Bestreben, das Glykosidbindungsverhalten am Schafherzgewebe möglichst umfassend zu charakterisieren, bietet sich als weitere Möglichkeit der Wechsel des Glykosides an.

So könnte durchaus erst die Verwendung von Herzglykosiden mit veränderter chemischer Struktur und einem von g-Strophanthin unterschiedlichen Konzentrations - Wirkungsspektrum die Existenz einer zusätzlichen Bindungsstelle, Unterschiede im Vergleich der Wirkung auf verschiedene Spezies oder aber unter-

schiedliche Affinitäten für unterschiedliche Gewebearten derselben Spezies aufzeigen (34).

Letzteres - eine selektiv erhöhte Affinität für das Reizleitungssystem im Vergleich zum Myokard - wird von Haustein u. a. für die Substanz 16α -Gitoxin postuliert [und noch zu diskutieren sein (184)].

Aus der großen Zahl der isolierten Herzglykoside (172) wurden 14 Substanzen mit unterschiedlicher chemischer Struktur ausgewählt, die in ihrer Wirkungsstärke um einen Faktor von mehr als 10^3 differierten. Zuerst wurde deren Bindungsaffinität an isolierten Zellmembranen des linken Ventrikelmyokards bestimmt und dann 5 Substanzen ausgewählt und auf ein eventuell unterschiedliches Bindungsverhalten an Zellhomogenaten des Ventrikelmyokards bzw. an Homogenaten aus Purkinjefasern untersucht. Der direkte Nachweis einer Bindung von Herzglykosiden ist bis heute nur durch die Verwendung von radioaktiv markierten Substanzen möglich, die jedoch nur für eine begrenzte Zahl kardial wirksamer Glykoside erhältlich sind.

Unter bestimmten Voraussetzungen, die von Jensen und Nørby (132) und Erdmann und Schoner (67, 68) beschrieben und von Weiland und Molinoff (258) zusammengefaßt wurden, ist es erlaubt, das Bindungsverhalten von unmarkierten Glykosiden indirekt, durch die konzentrationsabhängige, kompetitive Verdrängung eines radioaktiv markierten Glykosides [z. B. (^3H)-g-Strophanthin] von dem Rezeptor zu charakterisieren.

Falls (^3H)-g-Strophanthin und die unmarkierte Substanz um denselben Rezeptor konkurrieren, läßt sich die Dissoziationskonstante, K_D , der unmarkierten Substanz über die Bestimmung derjenigen Konzentration (IC_{50} -Wert) errechnen, die die (^3H)-g-Strophanthin-Bindung um 50 % hemmt (67).

Bei denjenigen Substanzen, die in Tritium-markierter Form erhältlich sind [z. B. (^3H)-Digoxin, (^3H)-Digitoxin, (^3H)- β -Acetyldigoxin (87)] hat ein Vergleich der Ergebnisse aus dieser indirekten Methode mit der direkten K_D -Bestimmung eine sehr enge Korrelation ergeben (30, 67).

Es ist jedoch zu beachten, daß eine große Anzahl von Substanzen bei ausreichend hoher Konzentration ohne Bindung an den Rezeptor die Anzahl des gebundenen (^3H)-g-Strophanthins ver-

ringern kann. Ähnliches geschieht, wenn - wie auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte - eine Substanz (z. B. Kalium) ohne Rezeptorbindung zu einer Änderung der Rezeptor-Konformation führt.

Demnach ist Vorsicht geboten, wenn allein auf Grund von indirekten Messungen behauptet wird, daß eine Substanz durch spezifische Bindung an einen Rezeptor wirkt.

In mehreren Veröffentlichungen des letzten Jahre verglichen Brown und Erdmann die Affinität der kardialen ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase des Rindes, der Katze, des Meerschweinchens und des Menschen zu zahlreichen Digitalis-Derivaten (32, 34, 36).

Die Affinität wurde dabei - wie eben beschrieben - indirekt, durch die konzentrationsabhängige (^3H)-g-Strophanthin-Verdrängung bestimmt und in Beziehung gesetzt zur Hemmung der spezifischen ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase und Hemmung des aktiven $^{86}\text{Rb}^+$ -Transportes durch diese Glykoside - beides Parameter des pharmakologischen Effektes. In einigen Versuchen wurde die Bindung ferner noch mit der Wirkung verschiedener Derivate auf elektrisch stimulierte, schlagende Gewebepreparate des Meerschweinchenherzens verglichen. Bei diesen Versuchsreihen fand sich eine enge Korrelation der indirekt ermittelten Affinitäten der unmarkierten Derivate mit deren pharmakologischen Wirkstärken.

Zielsetzung solcher Untersuchungen, die bereits frühzeitig von verschiedenen Arbeitsgruppen unternommen worden waren (55, 72, 73, 237) und auch "SAR-" (= Structure-Activity-Relationship)-Studien genannt werden, ist es unter anderem, die funktionelle Wirksamkeit von Änderungen innerhalb der chemischen Struktur der Herzglykoside beurteilen zu können bzw. eine Gewichtung funktioneller Gruppen treffen zu können.

Über die Entwicklung eines relativ einfachen Verfahrens - wie es die indirekte Bestimmung der Dissoziationskonstanten darstellt - versucht man zu einer standardisierten Methodik zu gelangen, die noch vor dem Einsatz umfangreicherer Tierversuche eine Aussage über die prinzipielle Wirksamkeit und mögliche, relative Wirkstärke eines struktural neuen Herzglykosides erlaubt.

Die Untersuchungen der Wirkungsstärken von verschiedenen Digitalis-Derivaten an unterschiedlichen Präparationen des Schafherzens in dieser Arbeit wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, die Brown und Erdmann (siehe oben) zur Charakterisierung an Katzen-, Rinder- und Menschen-Herzen verwandten.

Sowohl an isolierten Zellmembranen des linken Ventrikelmyokards (14 Derivate) als auch an Zellhomogenaten des linken Ventrikels und von Purkinjefasern (5 Derivate) führten die unmarkierten Substanzen zu Konzentrations-Wirkungskurven der (^3H)-g-Strophanthin-Bindung, die der des g-Strophanthins annähernd parallel waren und damit die Bindung an jeweils eine einzige und gleiche Rezeptorenart aufzeigten.

Die nahezu vollständige Hemmung der (^3H)-g-Strophanthin-Bindung durch diese verschiedenen Derivate unterstreicht noch einmal, daß - wie von Laduron (152) diskutiert - außer an die spezifische Bindungsstelle nur sehr wenig gebunden wird.

Die Wirkungsstärke der 14 gewählten Derivate, deren K_D -Werte indirekt aus der Bindung an isolierte Zellmembranen des linken Ventrikels bestimmt wurden, umfaßte dabei einen Konzentrationsbereich von mehr als 10^3 [von $K_D = 6.2 \times 10^{-10}\text{M}$ (Neriifolin) bis $K_D = 1.5 \times 10^{-6}\text{M}$ (Anhydrodigitoxigenin)].

Im Vergleich zur Wirkung auf isolierte Zellmembranen des Menschenherzens ist die absolute Wirkungsstärke jeder der untersuchten Substanzen am Schafherzen durchschnittlich um den Faktor 1.9 größer, die relativen Wirkstärken auf beide Spezies jedoch nahezu identisch - ein weiterer Hinweis auf die Ähnlichkeit der Bindungsstellen in beiden Arten.

Ferner ergab die Bindung von 5 Herzglykosiden - einschließlich der Substanz 16α -Gitoxin - an Zellhomogenaten aus Ventrikelmyokard und aus Purkinjefasern keinen Hinweis auf eine unterschiedliche Affinität der beiden Gewebearten für eine der Substanzen, d. h. es konnte für keine der 5 Derivate eine Gewebeselektivität nachgewiesen werden.

Eben dieses postulieren Haustein und Kollegen wiederholt für das von Lindig und Repke 1967 (165) synthetisierte, semisynthetische Derivat 16α -Gitoxin, das auf Grund einer geringeren Interaktion mit dem Reizleitungssystem eine größere therapeutische Breite als g-Strophanthin besitzen soll:

Sowohl am Meerschweinchen-Herzen in situ (118) als auch an isolierten Ventrikelstreifen (117) wurde für 16 α -Gitoxin ein größerer Effekt auf die Kontraktilität als auf die Rhythmizität beobachtet - d. h. eine Dissoziation von - erwünschter - positiv inotroper Wirkung und - unerwünschtem - arrhythmogenem Effekt.

Lebende, anästhesierte Hunde und Katzen zeigten bei 16 α -Gitoxin später QRS-Verbreiterungen im EKG bzw. einen größeren, positiv inotropen Effekt bei weniger EKG-Veränderungen als bei g-Strophanthin (119, 120).

An isolierten Purkinjefasern und an Ventrikelmuskulatur des Hundeherzens beobachteten Nowak und Haustein unter Aufzeichnung von Aktionspotentialen (184), daß 16 α -Gitoxin (1.5×10^{-6} M) einen selektiv schwächeren Effekt auf Purkinjefasern ausübt als eine vergleichbare g-Strophanthin-Konzentration (1.0×10^{-7} M). In den Untersuchungen von Haustein und Kollegen wurden jedoch bisher keine Bindungsstudien mit 16 α -Gitoxin vorgestellt.

Den vorliegenden Versuchen zu Folge besitzt 16 α -Gitoxin eine um den Faktor 100 geringere Affinität als g-Strophanthin an Zellhomogenaten des Schafherzens [$K_D = 1.0 \pm 0.3 \times 10^{-7}$ M (16 α -Gitoxin) bzw. $K_D = 1.7 \pm 0.45 \times 10^{-9}$ M (g-Strophanthin), 37° C, Purkinjefaserhomogenat]. Auf Grund der analogen (3 H)-g-Strophanthin-Verdrängungskurven (Abbildung 27) darf geschlossen werden, daß 16 α -Gitoxin und g-Strophanthin an denselben Rezeptor binden. Zwischen Ventrikelmuskulatur und Purkinjefasern waren weder in der Art der Verdrängungskurven noch in der Affinität zu 16 α -Gitoxin signifikante Unterschiede nachweisbar [$K_D = 1.0 \pm 0.3 \times 10^{-7}$ M (Purkinjefaser) bzw. $K_D = 9.9 \pm 0.05 \times 10^{-8}$ M (Myokard), vgl. Tabelle 8].

Diese Versuche konnten demnach weder eine erhöhte Wirksamkeit noch die postulierte Gewebeselektivität von 16 α -Gitoxin bestätigen.

Sollten weitere Versuche bei spezifischer Bindung dieser Substanz an den Glykosidrezeptor tatsächlich eine erhöhte therapeutische Breite nahelegen, so wäre sie wahrscheinlich Ausdruck einer unterschiedlichen Substanzverteilung innerhalb des Herzens.

Es wurde bereits erwähnt, daß die Untersuchungen der Wirkstärken cardialer Glykoside auch zum Ziel haben, die funktionelle Wertigkeit chemischer Gruppen in der Glykosidbindung zu identifizieren und die Bedeutung der Glykosidzusammensetzung aus Lakton-Ring, Stereoid-Gerüst und dem Zucker-Anteil zu evaluieren. Die Versuche dieser Arbeit am Schafherzen ergaben dabei keine spezies-spezifischen Unterschiede zu den von Brown et al. veröffentlichten Resultaten (die folgenden Beispiele sind den K_D -Werten an isolierten Zellmembranen des Schafmyokards, Tabelle 9, entnommen).

So hatte sich beispielsweise herausgestellt, daß der ungesättigte Lakton-Ring für eine Rezeptorbindung von großer Wichtigkeit ist, da eine Sättigung der C=C-Bindung zu einer erheblichen Minderung der Affinität führt (Digitoxin, $K_D = 1.5 \times 10^{-9}M$, im Vergleich zu Dihydrodigitoxin, $K_D = 2.6 \times 10^{-8}M$, oder Digoxin, $K_D = 2.5 \times 10^{-9}M$, zu Dihydrodigoxin, $K_D = 1.3 \times 10^{-7}M$).

Am Stereoid-Gerüst resultiert die Einführung polarer Hydroxylgruppen ebenfalls in einem Abfall der Wirkstärke (Digitoxin, $K_D = 1.5 \times 10^{-9}M$, im Vergleich mit seinem 16 β -Hydroxyl-Derivat, Gitoxin, $K_D = 1.0 \times 10^{-8}M$, und seinem 12 β -Hydroxyl-Derivat, Digoxin, $K_D = 2.5 \times 10^{-9}M$), während eine unpolare Acetylgruppe in Position 16 (Gitoxin, $K_D = 1.0 \times 10^{-8}M$, im Vergleich zu 16-Acetyl-Gitoxin, $K_D = 1.2 \times 10^{-9}M$) oder eine zusätzliche Formylsubstitution der 16 β -Hydroxylgruppe (Gitaloxin, $K_D = 1.0 \times 10^{-9}M$) die Affinität erhöht (57).

Die Anbindung eines Zuckers an das Aglykon erhöht in jedem Falle die Wirkstärke, die ihr Maximum jedoch mit 1 - 2 Zuckern erreicht hat und bei weiterer Erhöhung der Zuckerzahl wieder abfällt. Bei der Wahl des Zuckers führt die Verwendung von 5-Desoxy-Zuckern (z. B. α -L-Thevetose) zu den aktivsten Glykosiden (Neriifolin = Digitoxigenin thevetosid, $K_D = 6.2 \times 10^{-10}M$).

Eine Acetylierung des Zuckers reduziert die Affinität beträchtlich (16 Acetyl-Gitoxin, $K_D = 1.2 \times 10^{-9}M$, im Vergleich zu Penta-Actyl-Gitoxin, $K_D = 7.7 \times 10^{-8}M$).

Die überwiegende Mehrzahl der bisher durchgeführten Untersuchungen zum Verhältnis Glykosidstruktur und -Aktivität weisen

darauf hin (und die Versuche dieser Arbeit stimmen darin überein), daß jede Änderung des Glykosidmoleküls, an welcher Stelle auch immer, grundsätzlich die Wirkungsstärken beeinflussen kann, d. h. jeder Teil eines Herzglykosides für eine optimale Bindung an den Rezeptor von Bedeutung ist (33, 34, 107, 198).

4.3.2. Untersuchungen am elektrisch stimulierten, schlagenden Gewebe

Es stellte sich nunmehr die Frage, ob die an Zellhomogenaten nachgewiesenermaßen geringere Rezeptorenanzahl von Purkinjefasern auch am schlagenden Gewebe festzustellen ist und ob damit eine Differenz im pharmakologischen Effekt verbunden ist. Deshalb wurde einerseits gleichzeitig die g-Strophanthin-konzentrationsabhängige (^3H)-g-Strophanthin-Bindung und deren positiv inotrope Wirkung untersucht, andererseits eine zweite Versuchsreihe durchgeführt, in der der g-Strophanthin-konzentrationsabhängige, positiv inotrope Effekt und simultan der dabei stattfindende, aktive $^{86}\text{Rb}^+$ -Transport an elektrisch stimulierten, schlagenden Purkinjefasern und Moderatorbandstreifen des Schafherzens untersucht wurde.

$2 \times 10^{-8}\text{M}$ g-Strophanthin führte in beiden schlagenden Geweben zu einem ersten, meßbar signifikanten, positiv inotropen Effekt, dessen Maximum ohne jegliche Zeichen von Toxizität bei ca. $2 \times 10^{-7}\text{M}$ erreicht war. Daraus ergibt sich der halbmaximale, inotrope Effekt (EC_{50}) bei $8 \times 10^{-8}\text{M}$ (Purkinjefaser) und $7 \times 10^{-8}\text{M}$ [(Moderatorband), Abbildung 34]. $3 \times 10^{-7}\text{M}$ g-Strophanthin führte in beiden Geweben zwar zu dem eigentlichen, maximal inotropen Effekt, der jedoch nach Erreichen einen eindeutig stärkeren Abfall der kontraktile Kraft zur Folge hatte als vergleichbare Kontrollen erwarten ließen. Deshalb muß diese Konzentration bereits als toxisch bewertet werden. Dies zeigt die Schwierigkeit, den Beginn von Toxizität eindeutig festlegen zu wollen, die sich bei höheren Konzentrationen zusätzlich in leicht erkennbaren Arrhythmien und Kontrakturen äußerte. Bei allen g-Strophanthin-Konzentrationen traten sowohl positiv inotrope Effekte als auch die Zeichen

von Toxizität in Purkinjefasern zeitlich früher auf (Abbildung 35). Könnten diese Unterschiede auch einige Befunde, die von anderen Gruppen veröffentlicht wurden und später noch besprochen werden, erklären - so konnte ihnen nicht bei allen Konzentrationen statistische Signifikanz nachgewiesen werden. Auch deshalb bleibt die klinische Relevanz dieser relativ geringen Unterschiede fraglich.

Die Auswertung der (^3H)-g-Strophanthin-Bindungsdaten unter diesen Bedingungen zeigt sowohl in der Methodik nach Scatchard als auch in den Verfahren nach Woolf und Hill (Abbildungen 37 und 38), daß in beiden Geweben (^3H)-g-Strophanthin an einen einzigen, spezifischen und sättigbaren Rezeptor mit einer Affinität bindet, die sich in beiden Geweben nicht signifikant unterscheidet [$K_D = 3.4 \times 10^{-7}\text{M}$ (Purkinjefaser) und $K_D = 2.5 \times 10^{-7}\text{M}$ (Moderatorband)].

Bei einer Konzentration von $3 \times 10^{-7}\text{M}$ g-Strophanthin - derjenigen Konzentration, die den Übergang von maximal positiv inotroper Wirkung zu Toxizität markiert - sind demnach in beiden schlagenden Geweben ca. 50 % der Glykosidbindungsstellen besetzt. Aus den Bindungsdaten ist darüberhinaus ersichtlich, daß für einen ersten, mit dieser Methodik meßbaren, positiv inotropen Effekt (bei ca. $2 \times 10^{-8}\text{M}$) circa 10 - 15 % der Bindungsstellen besetzt werden müssen.

Dies unterstützt die Beobachtungen von Erdmann und Brown (80), die an Zellhomogenaten des linken Ventrikelmyokards von menschlichen Herzen 1.5×10^{14} Glykosidrezeptoren/g Feuchtgewicht bestimmten. Da Haasis et al. (110) im linken Ventrikel glykosidbehandelter Patienten eine Digoxin-Serumkonzentration von 69 ± 25 ng/mg Feuchtgewicht gemessen hatten - dies entspricht ungefähr einem Äquivalent von 0.4×10^{14} Molekülen/g - schlossen Erdmann und Brown, daß circa 25 % der kardialen Glykosidrezeptoren in diesen Patienten besetzt waren. Abzuglich einer unspezifischen Bindung und einer eventuell unterschiedlichen Rezeptoraffinität in vivo könnte demnach in Patienten, die Herzglykoside einnehmen, eine Rezeptorbesetzung von wahrscheinlich 10 - 20 % erwartet werden.

Als nächstes wurde die Wirkung von g-Strophanthin auf den spezifisch hemmbaren ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-Transport bei gleichzeitiger

Messung der positiv inotropen Wirkung untersucht, indem die Aufnahme von radioaktivem Rubidium ($^{86}\text{Rb}^+$) gemessen wurde, das nachweislich von dem Transportsystem der Zellmembran wie Kalium behandelt wird (25, 144, 231). Diese Methodik wurde von Yamamoto et al. (264) zuerst eingeführt und hat sich seitdem in zahlreichen Untersuchungen bewährt, um Veränderungen im transmembranösen K^+ -Transport beurteilen zu können (14, 35, 75, 158). In schlagenden Purkinjefasern und Moderatorbandstreifen des Schafherzens wurde die aktive, durch g-Strophanthin-hemmbarere $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme über denselben Konzentrationsbereich gehemmt, der auch den positiv inotropen Effekt zur Folge hatte (Abbildung 40).

Da die enge Korrelation dieser zwei Parameter des pharmakologischen Glykosideffektes auch am schlagenden Myokard des digitalisempfindlichen Katzenherzens festgestellt werden konnte (77), scheinen die Argumente von Eisner et al. (62), denen zu Folge die Hemmung von wenigen Pumpeinheiten noch nicht die $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme verringert, zumindest auf die digitalisempfindlichen Spezies Katze und Schaf nicht anwendbar.

Bei den relativ glykosidunempfindlichen Herzen der Spezies Ratte und Meerschweinchen blieb hingegen die $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in g-Strophanthin-Konzentrationsbereichen mit ausschließlich positiv inotropen Effekten unbeeinflusst und wurde erst bei toxischen Konzentrationen gehemmt (35, 75).

Diese Dissoziation der Glykosideffekte erbrachte dabei einen wichtigen Hinweis auf dem Weg zur Entdeckung von zwei verschiedenen Rezeptorarten in diesen Spezies.

Eine Dissoziation von Glykosidbindungen und den pharmakologischen Wirkungen untereinander - eventuell auch nur innerhalb eines begrenzten Glykosidkonzentrationsbereiches - könnte aber auch bedeuten, daß der Wirkungsmechanismus nicht oder nicht ausschließlich auf einer Hemmung der spezifischen ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität beruht (siehe auch 4.1). Bei niedrigen Strophanthin-Konzentrationen (10^{-9}M - 10^{-8}M) konnten einige Studien einen positiv inotropen Effekt ohne meßbare Hemmung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase (182, 186, 204) oder ohne Änderung des intrazellulären Natrium-Gehaltes zeigen (24, 39).

Ebenso berichteten Arbeiten von einer positiv inotropen Wirkung niedriger Digitalis-Konzentrationen mit einer Stimulation der Natrium-Pumpaktivität bzw. der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase in Zellhomogenaten (29, 46, 63, 102, 188).

An isolierten Zellmembranen blieb jedoch der einzig nachweisbare Glykosideffekt die Hemmung der Enzymaktivität (219, 233). Am schlagenden Meerschweinchenvorhof beobachteten Lechat et al. (158) bei 10^{-9}M g-Strophanthin eine signifikante Steigerung des aktiven $^{86}\text{Rb}^+$ -Transportes um 25 % ohne positiv inotrope Wirkung. Dieser Effekt konnte durch Gabe von Propranolol oder Atropin ausgelöscht werden.

Bei 10^{-8}M führte g-Strophanthin in Vorhöfen, die mit Atropin vorbehandelt waren, zu einem positiv inotropen Effekt ohne Beeinflussung des $^{86}\text{Rb}^+$ -Transportes. Da diese Wirkung nicht in Vorhöfen auftrat, denen Katcholamine entzogen worden waren, schien dieser Effekt von endogenen Katecholaminen abzuhängen. Ab 10^{-7}M g-Strophanthin konnte dann die erwartete Korrelation von positiver Inotropie und Hemmung des aktiven $^{86}\text{Rb}^+$ -Transportes beobachtet werden.

Aus diesen Resultaten schloß Lechat, daß bei verschiedenen Konzentrationen ein Glykosideffekt auch durch unterschiedliche Mechanismen bewirkt werden könnte.

Zumal Untersuchungen existieren, die zeigen, daß Digitalis den Metabolismus von endogenen Neurotransmittern beeinflusst (95, 222), wurde die Möglichkeit diskutiert, daß die Wirkung von Digitalis auf einer Kombination aus direktem Effekt auf die myocardiale $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase und der Interaktion mit neurogenen Transmittern beruht, - und daß zumindest in diesen Experimenten im niedrigen Glykosidkonzentrationsbereich ein indirekter, β -adrenerger Effekt von g-Strophanthin überwog.

An Purkinjefasern des Schafherzens konnten Wasserstrom et al. (257) jedoch keinen Einfluß von Propranolol auf das lineare Verhältnis von intrazellulärem Natrium-Gehalt und Spannung nachweisen.

In den vorliegenden Untersuchungen führten auch niedrige g-Strophanthin-Konzentrationen ($5 \times 10^{-8}\text{M}$) nicht zu einem Anstieg der aktiven $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme.

Bei dieser g-Strophanthin-Konzentration konnte ferner kein signifikanter Effekt von $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ L-Propranolol auf die positiv inotrope Wirkung des Glykosides oder dessen Hemmung der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme festgestellt werden.

Bedürfte es auch sicherlich weitergehender Versuche und einer Verfeinerung der Meßtechnik (besonders für die niedrigen Glykosidkonzentrationsbereiche) um indirekte, eventuell β -adrenerge Effekte sicher ausschließen oder nachweisen zu können, so ergaben die Untersuchungen an schlagenden Purkinjefasern des Schafherzens mit ihrer strengen Korrelation der untersuchten, pharmakologischen Effekte der g-Strophanthin-Bindung zumindest keinen Hinweis auf eine Beteiligung β -adrenerger Mechanismen.

Sowohl in schlagenden Purkinjefasern als auch Moderatorbandstreifen des Schafherzens führten g-Strophanthin-Konzentrationen, die benötigt wurden um 50 % der Bindungsstellen zu besetzen ($= K_D$), auch zu einer Hemmung des spezifischen, aktiven $^{86}\text{Rb}^+$ -Transportes um 50 % [$IC_{50} = 2.5 \times 10^{-7} \text{ M}$ (Purkinjefasern) bzw. $3.3 \times 10^{-7} \text{ M}$ (Moderatorband)].

Die maximale $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme (die Glykosidspezifität betrug in beiden Geweben 60 - 65 %) war jedoch in Purkinjefasern ($2.7 \mu\text{mol}/15 \text{ min/g}$ Feuchtgewicht) um ca. 40 % niedriger als im Moderatorband ($4.4 \mu\text{mol}$).

Mit diesem Befund korrespondiert auch die Anzahl der Rezeptoren, die aus den (^3H)-g-Strophanthin-Bindungsdaten für die beiden Gewebearten ermittelt werden konnten, da schlagende Purkinjefasern nur etwa die Hälfte der Rezeptoren besitzen ($2 \times 10^{14}/\text{g}$ Feuchtgewicht), die in schlagenden Moderatorbandstreifen nachzuweisen sind (3.9×10^{14}).

Die Ursache der höheren Anzahl von g-Strophanthin-Bindungsstellen in schlagenden Geweben gegenüber den Zellhomogenaten (vgl. Tabelle 10) ist nicht geklärt, könnte jedoch auch auf den Verlust von Bindungsstellen durch das Aufbrechen der Zellmembranen während der Homogenat-Präparation zurückzuführen sein.

In Tabelle 10 sind noch einmal synoptisch die wichtigsten Parameter zusammengefaßt, die zahlenmäßig die qualitativen Gemeinsamkeiten und quantitativen Unterschiede von Purkinjefasern und Moderatorband (= Arbeitsmyokard) aufzeigen.

Da die Konzentrations-Wirkungs-Kurven - zusammengefaßt in den Abbildungen 41 und 42 - der g-Strophanthin-Bindung, des positiv inotropen Effektes und der Hemmung der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in beiden Gewebearten koinzident sind, kann die spezifische g-Strophanthin-Bindungsstelle in schlagenden Purkinjefasern und Moderatorbandstreifen als Rezeptor für den inotropen Glykosideffekt bezeichnet werden, der Teil des $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Enzyms ist, das für den aktiven Na^+/K^+ -Transport verantwortlich ist.

Die frühesten, vergleichenden Untersuchungen haben die Wirkung von Strophanthin auf die Reizleitungsgeschwindigkeit an Herzen von Hunden in situ gemessen:

Moe und Mendez (179) demonstrierten 1951, daß Strophanthin K die Reiz-Überleitung in Purkinjefasern bei Konzentrationen unterdrückte, die im Ventrikelmuskulatur noch keine Veränderungen hervorriefen. Ähnliches berichteten Banka et al. (19) und Swain und Weidner 1957 (234), die zusätzlich bereits beobachteten, daß ein g-Strophanthin-induziertes, ventrikuläres Flimmern ursächlich auf einer erhöhten Automtizität mit gleichzeitiger Unterdrückung der Überleitung in Purkinjefasern beruhen kann.

Häuften sich auch in den letzten Jahren die Befunde, daß funktionell verschiedene Herzgewebe auch verschiedene elektrophysiologische und physiologische Eigenschaften besitzen (51, 223), so haben elektrophysiologische Studien doch unterschiedliche, sich oftmals auch widersprechende Ergebnisse der g-Strophanthin-Wirkung auf das Reizleitungssystem bzw. das Arbeitsmyokard erbracht:

Vassalle et al. (245) zeigten an mit Mikroelektroden stimulierten Purkinjefasern und Ventrikelsegmenten aus demselben Hundeherzen, daß eine g-Strophanthin-induzierte Toxizität wesentlich früher in Purkinjefasern erfolgte und zur Unregelmäßigkeit führte - und daß nur Purkinjefasern Automtizität, d. h. Schrittmacheraktivität, entwickelten, da nur bei ihnen eine zunehmende Intoxikation zu einer successiven, diastolischen Depolarisation führte, die letztendlich in Extrasystolen und spontanem Eigenrhythmus mündete.

Tabelle 10:

Vergleich der g-Strophanthin-Wirkungen am Glykosidrezeptor von Purkinjefasern und Moderatorbandstreifen des Schafherzens.
(Zusammenfassung)

	PURKINJEFASER	MODERATORBAND
ZEL LHOMOGENATE		
Dissoziationskonstante (K_D) (^3H -g-Strophanthin-Bindung)	$1.9 \times 10^{-9} \text{ M}$	$2.1 \times 10^{-9} \text{ M}$
Bindungsstellen/g Feucht- gewicht	0.33×10^{14}	1.1×10^{14}
ELEKTRISCH STIMULIERTES, SCHLAGENDES GEWEBE		
EC_{50} (positive Inotropie)	$8 \times 10^{-8} \text{ M}$	$7 \times 10^{-8} \text{ M}$
Dissoziationskonstante (K_D) (^3H -g-Strophanthin-Bindung)	$3.4 \times 10^{-7} \text{ M}$	$2.5 \times 10^{-7} \text{ M}$
Bindungsstellen/g Feucht- gewicht	2.0×10^{14}	3.9×10^{14}
IC_{50} ($^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme)	$2.5 \times 10^{-7} \text{ M}$	$3.3 \times 10^{-7} \text{ M}$
Spezifische $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme/ 15 min/g Feuchtgewicht	$2.7 \text{ } \mu\text{mol}$	$4.4 \text{ } \mu\text{mol}$
Umsatzzahl (turnover number)	540 /min	430 /min

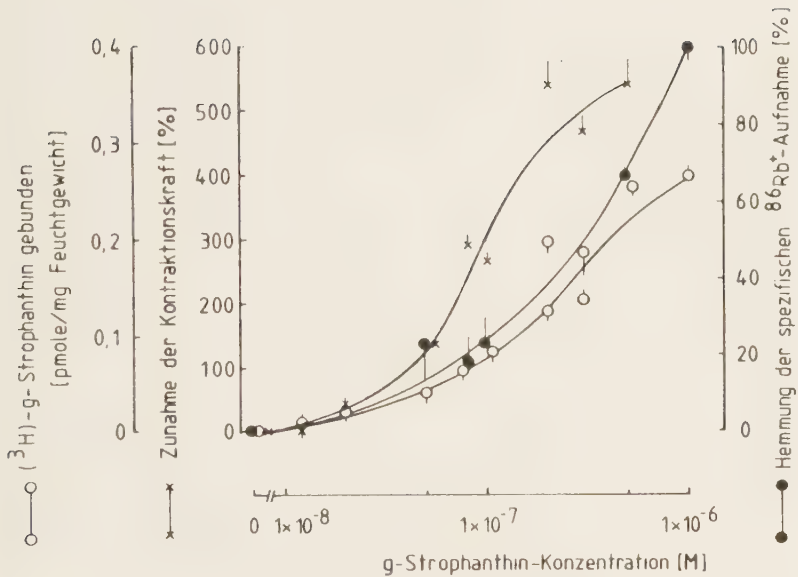


Abbildung 41:

Synopsis von konzentrationsabhängiger (^3H) -g-Strophanthin-Bindung und konzentrationsabhängiger, pharmakologischer Wirkung auf den aktiven Ionentransport und die Inotropie an schlagenden Purkinjefasern des Schafherzens

Die (^3H) -g-Strophanthin-Bindung ($\circ-\circ$), prozentuale Hemmung der spezifischen $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme ($\bullet-\bullet$) und prozentuale, positiv inotrope Wirkung ($\times-\times$) an schlagenden Purkinjefasern wurden in Abhängigkeit der g-Strophanthin-Konzentration aufgetragen. Die Daten wurden den Abbildungen 34, 36 und 40 entnommen.

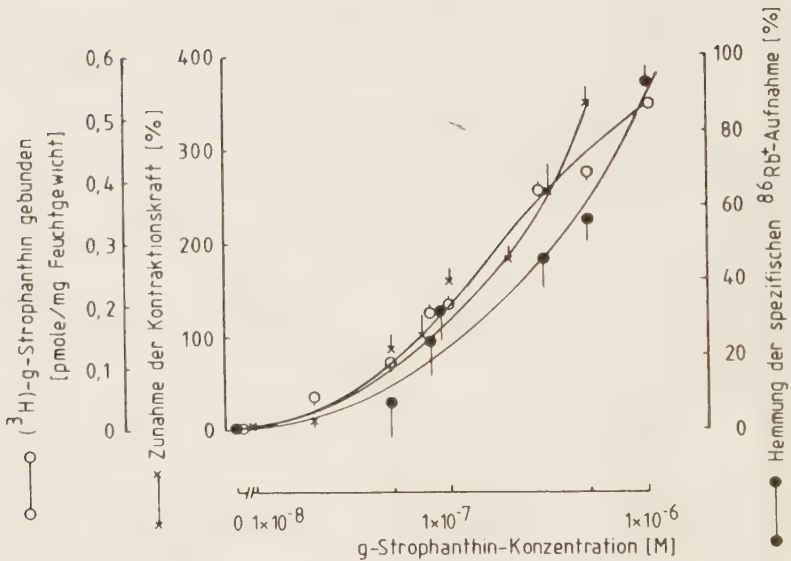


Abbildung 42:

Synopsis von konzentrationsabhängiger (³H)-g-Strophanthin-Bindung und konzentrationsabhängiger, pharmakologischer Wirkung auf den aktiven Ionentransport und die Inotropie an schlagenden Moderatorbandstreifen des Schafherzens

Die (³H)-g-Strophanthin-Bindung (o-o), prozentuale Hemmung der spezifischen ⁸⁶Rb⁺-Aufnahme (●-●) und prozentuale, positiv inotrope Wirkung (x-x) an schlagenden Moderatorbandstreifen wurden in Abhängigkeit der g-Strophanthin-Konzentration aufgetragen.

Die Daten wurden den Abbildungen 34, 36 und 40 entnommen.

Nowak und Haustein (184) konnten mit g-Strophanthin und 16epi-Gitoxin ebenfalls am Hundeherzen diese Beobachtungen bestätigen und auch Hollander (126) beobachtete, daß eine fast 3-fach höhere g-Strophanthin-Konzentration notwendig war, um im Ventrikelmyokard Toxizität zu produzieren als in Purkinjefasern. Die Forschungsgruppe um Vassalle veröffentlichte in den darauf folgenden Jahren (192, 193) Messungen des Kaliumstromes mit radioaktivem Kalium ($^{42}\text{K}^+$) und begründete die beobachtete erhöhte Glykosidsensitivität damit, daß in Purkinjefasern des Hundes eine größere Zunahme des aktiven Ionentransportes bei elektrischer Stimulation erfolgte als in Papillarmuskeln der Katze. Als weitere Evidenz für eine unterschiedliche Glykosidempfindlichkeit wurden differierende, intra- und extrazelluläre Ionenverteilungen angesehen (194, 250).

Das Verhältnis von Na^+/Ca^+ , das am Hundeherzen benötigt wurde, um eine bestimmte Kontraktionskraft aufrechtzuerhalten, war in Purkinjefasern niedriger als im Ventrikelmyokard (164).

Dabei hing die Kontraktionskraft der Purkinjefasern stärker von extrazellulärem Ca^+ (247) und von intrazellulärem Na^+ (248) ab als im Ventrikelmyokard.

Diese Befunde blieben nicht unwidersprochen, zumal andere Gruppen, die ebenfalls die Veränderungen der Kontraktionskraft durch Änderungen der Natrium- und Calcium-Konzentrationen untersuchten (181) durchaus Übereinstimmungen zwischen den beiden Gewebearten finden konnten:

So wurden ähnliche g-Strophanthin-Effekte auf die Änderung des Ruhe- und Aktionspotentials gemessen (Kassebaum, 139).

Marban und Tsien (171) konnten zeigen, daß bei niedrigen Strophanthin-Konzentrationen (20 nM) der langsame Calcium-Einstrom, I_{Si} , übereinstimmend, sowohl in elektrisch stimulierten Papillarmuskeln des Hundes als auch in Purkinjefasern des Rindes erhöht wurde und zur Kontraktionskraftzunahme führte.

Sowohl in Ventrikeltrabekeln als auch Purkinjefasern des Schafherzens resultierten niedrige Strophanthin-Konzentrationen ($5 \times 10^{-8}\text{M}$) in einem ähnlichen Abfall der Spannung mit Verlängerung des Aktionspotentials, während höhere Konzentrationen eine Zunahme der Spannung mit Verkürzung der Aktionspotentialdauer in beiden Geweben bewirkte (115).

Es seien nun noch einige elektrophysiologische Arbeiten erwähnt, deren Zielsetzung nicht in dem Vergleich von Myokard und Purkinjefasern bestand, deren Untersuchungen gleichwohl diese Frage berührten. Aus dem großen Spektrum der Studien seien exemplarisch einige Ergebnisse erwähnt:

Im Schafherzen fanden Fozzard und Kollegen (47, 132) eine qualitativ ähnliche, frequenzabhängige Erhöhung des intrazellulären Natriumgehaltes (a_{Na}^i) in beiden Gewebearten. Ebenfalls ähnlich reagierte am Hundeherzen die intrazelluläre Natriumkonzentration beider Gewebe auf die Applikation von Katecholaminen (Wasserstrom, 256).

Da am nicht stimulierten Schafherzen die intrazellulären Natrium- und Calcium-Konzentrationen am Ventrikelmyokard niedriger ($a_{Na}^i = 6.9\text{mM}$, $a_{Ca}^i = 70\text{nM}$) waren als in Purkinjefasern ($a_{Na}^i = 7.9\text{mM}$, $a_{Ca}^i = 98\text{nM}$), führen Lado et al. (151) eine erhöhte Glykosidempfindlichkeit des Reizleitungssystems auf dessen höheren Calciumgehalt zurück. Demgegenüber fanden jedoch Weingart und Hess (259) - ebenfalls am Schafherzen - keine Unterschiede in den Calciumkonzentrationen der beiden Gewebearten.

Gleichzeitige Messungen von Kontraktionskraft und a_{Na} ließen darauf schließen, daß die positiv inotrope Wirkung von Dihydro-g-Strophanthin (Lee et al., 159), g-Strophanthin, Acetylstrophanthidin und Actodigin (Wasserstrom et al., 257) oder Strophanthidin (Eisner et al., 62) an Purkinjefasern des Schafherzens - und von Strophanthin an Purkinjefasern des Hundeherzens (Lee et al., 159) - eng mit dem Anstieg des intrazellulären Natriums verbunden ist.

Toxische Effekte traten an Purkinjefasern des Schafherzens dann auf, wenn der Natriumgehalt (a_{Na}) 30mM erreicht oder überschritten hatte (Lee et al., 159).

Ferrier (84) beobachtete sowohl für Myokard als auch für Purkinjefasern des Hundeherzens erste Depolarisationen bei $2 \times 10^{-7}\text{M}$ Acetylstrophanthidin.

Die Schwellenwert-Konzentration von g-Strophanthin, um in Purkinjefasern des Schafherzens einen Anstieg des (a_{Na}) zu bewirken, lag wiederholt bei ca. $1 \times 10^{-7}\text{M}$ (Wasserstrom et al., 257; Ellis, 63) obwohl Blood (27) einen raschen, reversiblen, positiv inotropen Effekt bereits bei $5 \times 10^{-10}\text{M}$

g-Strophanthin entdecken konnte und Hart und Noble (116) bei 2 Schaf-Purkinjefasern bei $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ g-Strophanthin einen Effekt auf die Ausgangsspannung bemerkten.

Die vorliegenden Untersuchungen ergaben nicht-toxische, positiv inotrope Wirkungen und Hemmung des aktiven Na^+/K^+ -Transportes sowohl in Purkinjefasern als auch Moderatorbandstreifen bei g-Strophanthin-Konzentrationen von $2 \times 10^{-8} \text{ M}$ - $2 \times 10^{-7} \text{ M}$ - also ähnlich denjenigen, bei denen auch der Anstieg der intrazellulären Natrium-Konzentration beobachtet wurde.

Die Tatsache, daß bei identischem Rezeptor weniger Rezeptoren in Purkinjefasern nachgewiesen wurden, könnte die höheren Ionenaktivitäten erklären und ebenfalls den von Vassalle (245) und Nowak und Haustein (184) - wie auch in dieser Arbeit - gefundenen, zeitlich früheren Eintritt der Toxizität in Purkinjefasern des Schafherzens in dieser Hinsicht deuten.

In biochemischen Studien verglichen zuerst Kübler und Endres (145) und Kübler und von Smekal (146) die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivitäten von Reizleitungssystem und Arbeitsmyokard. Diesen Untersuchungen zu Folge besaß in isolierten Zellmembranen des Rinderherzens das Reizleitungssystem mit ca. 0.05 U/g eine wesentlich geringere Enzymaktivität (gemessen mit der Methode von Schoner, 217) als das Arbeitsmyokard (ca. 0.45 U/g). In diesen Studien war die Glykosidempfindlichkeit - gemessen als $\text{IC}_{50} = \text{K}_i = 50 \text{ \%}$ -Hemm-Konzentration der ATPase-Aktivität - für das Reizleitungssystem (R) im Vergleich zum Arbeitsmyokard (A) ebenfalls reduziert:

k-Strophanthin: $8.8 \times 10^{-6} \text{ M}$ (R) bzw. $3.05 \times 10^{-6} \text{ M}$ (A)

Digoxin: $4.13 \times 10^{-6} \text{ M}$ (R) bzw. $2.39 \times 10^{-6} \text{ M}$ (A)

Digitoxin: $3.14 \times 10^{-6} \text{ M}$ (R) bzw. $1.44 \times 10^{-6} \text{ M}$ (A)

Bereits Palfi et al. (187) fielen die relativ niedrigen Affinitäten ($\text{IC}_{50} = \text{ca. } 10^{-6} \text{ M}$) in Küblers Arbeiten auf. Ebenfalls an Rinderherzen, aber an Zellhomogenaten aus Papillarmuskeln und Purkinjefasern des linken Ventrikels, fand Palfi eine höhere Empfindlichkeit der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase des Rinderherzens, die sich dabei für g-Strophanthin zwischen Reizleitungssystem ($\text{IC}_{50} = 4.74 \times 10^{-8} \text{ M}$) und Myokard ($\text{IC}_{50} = 4.13 \times 10^{-8} \text{ M}$) nicht signifikant unterschied.

Die spezifische ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität - in Homogenaten wesentlich geringer als in isolierten Zellmembranen - war jedoch auch in dieser Arbeit für das Myokard höher.

Eine von Palfi aufgestellte These, daß möglicherweise durch den freieren Zugang zum Reizleitungssystem in vivo mehr Glykosid "wirken" kann - hatten Hammermann et al. bereits 1971 versucht zu widerlegen (112):

Nach intravenöser Injektion von 0.03 mg (^3H)-Digoxin/kg bei 8 Schafen konnten sie an Homogenaten zeigen, daß das Myokard - und nicht etwa das Reizleitungssystem - signifikant mehr (27.5 %) (^3H)-Digoxin gebunden hatte als das His-Bündel - mithin eine eventuell größere Glykosidintensität des Reizleitungssystems nicht auf einer vermehrten Glykosidaufnahme in vivo beruhen konnte.

Dies bestätigten Versuche von Rhee (204) mit (^3H)-g-Strophanthin an verschiedenen Gewebeteilen des Hundeherzens.

Somberg et al. (231) verglichen die in vitro-Aufnahme von $^{86}\text{Rb}^+$ an Hundeherzen zwischen Purkinjefasern und Myokard nach in vivo-Infusion von therapeutischen oder toxischen Digoxin-Konzentrationen. Bei therapeutischen Digoxin-Serumspiegeln war die aktive $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in Myokard um 17 %, in Purkinjefasern hingegen um 44 % reduziert. Diesem Befund entsprach eine erhöhte Sensitivität der Purkinjefasern, gemessen als IC_{50} der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme (ca. $0.4 \times 10^{-6}\text{M}$ Digoxin), gegenüber dem Arbeitsmyokard (ca. $1.4 \times 10^{-6}\text{M}$) - bei absolut gesehen höherer $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme des Reizleitungssystems [1.62 nmol/mg Feuchtwicht/15 min bzw 0.49 (Myokard)].

Chinidin, das bekanntlich die Serum-Digoxin-Konzentration erhöht, führte in chronisch digitalisierten Hunden zu einer weiteren Abnahme der aktiven $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in Purkinjefasern, alterierte diese Aufnahme jedoch nicht in ventrikulärem Myokard (231).

Mit einer Methodik, die derjenigen von Somberg et al. sehr ähnlich war, untersuchte Rhee (204, 205) - ebenfalls an Hundeherzen - die aktive $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme und (^3H)-g-Strophanthin-Bindung im Vergleich von Purkinjefasern und Myokard:

Auch er berichtete von einer absolut höheren (ca. 4-fach), spezifischen $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in Purkinjefasern gegenüber dem

Ventrikelmuskulatur - und bestätigte damit auch die Arbeit von Polimeni und Vassalle (192) - doch fand sich kein signifikanter Unterschied in der Hemmung der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme durch g-Strophanthin [$\text{IC}_{50} = 4 \times 10^{-7} \text{M}$ (Purkinjefaser) bzw. $6 \times 10^{-7} \text{M}$ (Myokard)]. Die (^3H)-g-Strophanthin-Bindung in vitro unter diesen Bedingungen erfolgte ebenfalls über denselben Konzentrationsbereich und ohne signifikanten Unterschied.

Daraus schloß Rhee, daß kein Sensitivitätsunterschied zwischen Reizleitungssystem und Myokard existiert, da sich die Glykosidempfindlichkeit aus der prozentualen Hemmung der aktiven $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme berechnet und nicht aus dem Vergleich der absoluten Beträge.

Die Ergebnisse von Somberg (231) unterscheiden sich beträchtlich von den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, in denen ein nahezu identischer IC_{50} -Wert für beide Gewebearten, jedoch eine höhere $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme für das Moderatorband (Myokard) nachgewiesen werden konnte.

Dabei beruhen die Untersuchungen von Somberg auf Messungen der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in ruhendes, nicht stimuliertes Gewebe in vitro - nach Applikation des Glykosides in vivo.

Auch wenn die Studie von Akera et al. (14) diese Methodik von Somberg empfiehlt, um die Na^+ -Pumpaktivität adäquat zu determinieren, muß erwähnt werden, daß eine Aussage über eine eventuelle Korrelation zwischen Besetzung des Glykosidrezeptors durch g-Strophanthin und dessen Wirkung auf die Kontraktionskraft oder den aktiven Na^+/K^+ -Transport nur dann getroffen werden kann, wenn man diese Parameter gleichzeitig und unter identischen Bedingungen mißt.

Der Überblick über die bis heute durchgeführten Untersuchungen und den gegenwärtigen Forschungsstand zeigt, daß zwar unterschiedliche und wichtige Ansätze vorliegen, daß diese jedoch auf Grund der zumindest partiellen Divergenz ihrer Ergebnisse bislang keine eindeutige und widerspruchsfreie Bewertung der Fragestellung zuließen.

Auch wenn es nicht Ziel der vorliegenden Arbeit sein konnte, die veröffentlichten Einzelergebnisse in jedem Fall miteinander in Einklang zu bringen, so wurde hiermit zum ersten Male

der Versuch unternommen, die Empfindlichkeit des Reizleitungssystems auf Herzglykoside in einem integrativen Ansatz unter gleichzeitiger Berücksichtigung mehrerer, für die Pharmakowirkung bedeutsamer Teilschritte zu untersuchen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ventrikuläre Arrhythmien, die vorwiegend von dem peripheren Reizleitungssystem ausgelöst werden, zählen auch 200 Jahre nach William Withering zu den häufigsten und klinisch bedeutsamsten, toxischen Nebenwirkungen im Rahmen einer Therapie mit Herzglykosiden. Bis heute konnte nicht hinreichend geklärt werden, ob dieser Glykosidwirkung eine erhöhte Glykosid-"Empfindlichkeit" des Reizleitungssystems gegenüber dem Arbeitsmyokard zu Grunde liegt. Ein Nachweis von qualitativen Unterschieden der Glykosid-Bindung und -Wirkung, die eine vielleicht vorhandene, erhöhte Glykosid-Sensitivität erklären könnte, würde eventuell die Möglichkeit beinhalten, durch Synthetisierung spezieller Herzglykoside die therapeutisch erwünschten Wirkungen von den toxisch arrhythmogenen Effekten zu trennen - und damit die therapeutische Breite von Herzglykosiden zu erhöhen.

Deshalb wurde mit unterschiedlichen methodischen Ansätzen versucht, die Glykosid-Bindung und ihre pharmakologischen Wirkungen am Reizleitungssystem (Purkinjefasern) und am Ventrikelmyokard des Schafherzens miteinander zu vergleichen.

Die Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit erlauben folgende Aussagen:

- 1) Das Schaf gehört zu der Gruppe der digitalisempfindlichen Spezies wie Katze, Rind, Hund und Mensch
- 2) Am Schafherzen läßt sich ein einziger glykosidspezifischer Rezeptor nachweisen, der mit einer dem menschlichen Herzen ähnlichen Affinität zu einer ähnlichen Glykosid-Rezeptor-Bindungsreaktion führt.
Die vorliegenden Untersuchungen konnten keine Resultate erbringen, die die Existenz einer zweiten Rezeptorenart wahrscheinlich erscheinen lassen.
- 3) Der Rezeptor zeigt bei der Beurteilung der allgemein anerkannten Parameter von Rezeptorkinetik und -dynamik keine qualitativen Unterschiede in Purkinjefasern und Ventrikelmyokard. Der gleiche Rezeptor bedeutet auch

gleiche Affinität - d. h. gleiche qualitative Empfindlichkeit von Purkinjefasern und Arbeitsmyokard zu g-Strophanthin.

- 4) Die Bindung von g-Strophanthin korreliert an isolierten Zellmembranen mit der Hemmung der spezifischen ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität und an schlagenden Geweben einerseits mit der Hemmung der spezifischen, aktiven $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme als dem Maß des aktiven, transmembranösen Na^+/K^+ -Transportes und andererseits mit dem Auftreten des positiv inotropen Effektes.

Dies bestätigt den in 1.3 dargelegten, postulierten Wirkungsmechanismus von Herzglykosiden.

- 5) Purkinjefasern verfügen im Vergleich zum Arbeitsmyokard über weniger - wahrscheinlich nur über ca. 50 % - Glykosidrezeptoren pro Zelloberfläche.

Ausgehend von der Theorie der prozentualen Rezeptorbesetzung bedeutet dies, daß bei einer bestimmten Glykosidkonzentration sowohl im Arbeitsmyokard als auch in Purkinjefasern der gleiche Prozentsatz an Rezeptoren besetzt wird, daß dann jedoch - absolut gesehen - in Purkinjefasern weniger Rezeptoren zur Kompensation der ausgefallenen (= gehemmten) ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Moleküle zur Verfügung stehen.

Bei gleichen Zellgrößen und vergleichbarem Bedarf an Kationen-Umsatzraten könnte demzufolge die Kationen-Pumpfähigkeit in Purkinjefasern "früher" insuffizient werden. Eine solche, "quantitativ erhöhte" Glykosidempfindlichkeit könnte zwar einige, in der Literatur beschriebene Beobachtungen erklären, äußerte sich jedoch im Rahmen unserer Untersuchungen nur in einem zeitlich - und nicht konzentrationsmäßig - früheren Eintreten des positiv inotropen Effektes und der Toxizität in Purkinjefasern. Bestehen auch theoretisch die Möglichkeiten, daß die unbesetzten Rezeptoren "kompensatorisch" ihre Umsatzfähigkeit erhöhen könnten oder daß zum ausreichenden Funktionieren des Na^+/K^+ -Transportes nicht 100 % der Rezeptoren benötigt werden, d. h. im Normalfall ein Teil der Rezeptoren arbeitsmäßig stillgelegt ist und erst bei Bedarf "aktiviert" wird, so konnten die vorliegenden

Untersuchungen eine solche "Reserve-Kapazität" weder im Myokard noch in Purkinjefasern nachweisen (vgl. Abbildungen 14, 47 - 48).

- 6) Bei der Übertragbarkeit der Resultate auf das menschliche Herz oder auf die Zustände in vivo ist selbstverständlich äußerste Vorsicht geboten. In vivo gibt es vielfältige Möglichkeiten - von dem eventuell leichteren Zugang des Glykosides an Purkinjefasern, der noch nicht hinreichend geklärt ist, bis zu veränderten Ionenbedingungen und geweblichen Faktoren - die zu einer "relativ" höheren Glykosidempfindlichkeit des Reizleitungssystems führen könnten.

Es konnte jedoch demonstriert werden, daß die Untersuchungen starke Übereinstimmungen und Ähnlichkeiten der Spezies Schaf und Mensch ergeben haben, die das Schafherz als günstigeres Modell erscheinen lassen um Vorgänge der Glykosid-Bindung und -Wirkung zu untersuchen, als zum Beispiel das Meerschweinchenherz.

- 7) Sollten sich die Resultate am Schafherzen auch am menschlichen Herzen reproduzieren lassen, - d. h. sollten auch am menschlichen Herzen keine qualitativen sondern nur quantitative Unterschiede in der Glykosid-Bindung am Rezeptor nachweisbar sein, so würde dies für das Verhältnis von positiv inotropem Effekt am Arbeitsmyokard zu arrhythmogener Wirkung am Reizleitungssystem bedeuten, daß durch strukturelle Modifizierung von Herzglykosiden mit Änderung der Affinitäten keine Gewebeselektivität und damit keine Erhöhung der therapeutischen Breite von Herzglykosiden erreicht werden könnte.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. AARHUS, L. L., SHEPHERD, D. T., TYCE, G. M., VERBEUREN, T. J., VANHOUTTE, P. M. (1983):
Contraction of canine vascular smooth muscle cells caused by ouabain are due to release of norepinephrine from adrenergic nerve endings
Circ. Res.; 52: 501 - 507
2. ADAMS, R., SCHWARTZ, A., GRUPP, G., GRUPP, I., LEE, S., WALLICK, E. T., POWELL, T., TWIST, V., GATHIRAM, P. (1982):
High affinity ouabain binding site and low dose positive inotropic effect in rat myocardium
Nature; 296: 167 - 169
3. ALBERS, R. W., KORAL, G. J., SIEGEL, G. J. (1968):
Studies on the interaction of ouabain and other cardio-active steroids with sodium-potassium-activated ATPase
Mol. Pharmacol.; 4: 324 - 336
4. ALLEN, D. G., BLINKS, J. R. (1978):
Calcium transients in aequorin-injected frog cardiac muscle
Nature; 273: 509 - 513
5. ALLEN, D. G., EISNER, D. A., WRAY, S. C. (1985):
Birthday present for digitals
Nature; 316: 674 - 675
6. ALLEN, J. C., BESCH, H. R., GLICK, G., SCHWARTZ, A. (1970):
The Binding of Tritiated Ouabain to Sodium- and Potassium Activated ATPase and Cardiac Relaxing System of Perfused Dog Heart
Mol. Pharmacol.; 6: 441
7. ALLEN, J. C., SCHWARTZ, A. (1970):
Effects of potassium, temperature and time on ouabain interaction with the cardiac Na^+/K^+ -ATPase: further evidence supporting an allosteric site
J. Mol. Cell. Cardiol.; 1: 39 - 45
8. ALLEN, J. C., MARTINEZ-MALDONADO, M., EKNOYAN, G., SUKI, W. N., SCHWARTZ, A. (1971):
Relation between digitalis binding in vivo and inhibition of sodium, potassium-adenosine triphosphatase in canine kidney
Biochem. Pharmacol.; 20: 73 - 80
9. AKERA, T., BRODY, T. M. (1971):
Membrane adenosine triphosphatase: the effect of potassium on the formation and dissoziation of the ouabain-enzyme-complex
J. Pharmacol. Exp. Ther.; 176: 545 - 557

10. AKERA, T., BASKIN, S. J., TOBIN, T., BRODY, T. M. (1973):
Ouabain: temporal relationship between the inotropic effect and the in vitro binding to, and dissoziation from (Na^+, K^+) -activated ATPase.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.; 277: 151 - 162
11. AKERA, T., BRODY, T. M., SO, R. H.-M., TOBIN, T., BASKIN, S. J. (1974):
Factors and agents that influence cardiac glycoside- Na^+, K^+ -ATPase interaction
Ann.N.Y.Acad.Sc.; 242: 617 - 634
12. AKERA, T., BRODY, T. M. (1977):
The role of Na^+, K^+ -ATPase in the inotropic action of digitalis
Pharmacol. Rev.; 29: 187 - 220
13. AKERA, T., TEMMA, K., WIEST, S. A., BRODY, T. M. (1978):
Reduction of the equilibrium binding of cardiac glycosides and related compounds to Na^+, K^+ -ATPase as a possible mechanism for the potassium-induced reversal of their toxicity
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.; 304: 157 - 167
14. AKERA, T., YAMAMOTO, S., TEMMA, K., KIM, D. H., BRODY, T. M. (1981):
Is ouabain-sensitive rubidium or potassium uptake a measure of sodium pump activity in isolated cardiac muscle?
Biochim. Biophys. Acta; 640: 779 - 790
15. ANDERSON, G. J. (1974):
 K^+ -mediated release of ouabain from purkinje cells
Amer. J. Cardiol.; 33: 123
16. BAILEY, J. C., ANDERSON, G. J., FISCH, C. (1973):
Digitalis-induced longitudinal dissoziation in canine cardiac Purkinje fibers
Amer. J. Cardiol.; 32: 202 - 208
17. BAKER, P. F., MANIL, J. (1968):
The rates of action of K^+ and ouabain on the sodium pump in squid axons
Biochim. Biophys. Acta; 150: 328 - 330
18. BAKER, P. F., WILLIS, J. S. (1970):
Potassium ions and the Binding of cardiac glycosides to mammalian cells
Nature; 226: 521 - 523
19. BANKA, V. S., SCHERLAG, P. J., HELVANT, R. H. (1975):
Contractile and electrophysiological responses to progressive digitalis toxicity
Cardiovascular Res.; 9: 65 - 72
20. BARNETT, R. E. (1970):
Effect of monovalent cations on the ouabain inhibition of the sodium and potassium ion activated adenosine triphosphatase
Bioch.; 9: 4644 - 4648

21. BARTELS, H.-J., HESCH, R.-D. (1973):
Homotrope, kooperative Effekte und aufsteigende B/F-Kurven bei Hormon-Antikörperreaktionen.
Klin. Biochem.; 11: 311 - 318
22. BASTIDE, F., MEISSNER, G., FLEISCHER, S., POST, R. L. (1973):
Similarity of the active site of phosphorylation of the adenosine triphosphatase from transport of sodium and potassium ions in kidney to that for transport of calcium ions in the sarcoplasmatic reticulum of muscle
J. Biol. Chem.; 248: 8385 - 839
23. BELLER, G. A., SMITH, T. W., ABELMAN, W. H., HABER, E., HOOD, W. B. (1971):
Digitalis intoxication. A prospective clinical study with serum level correlations
N. Engl. J. Med.; 284: 989 - 997
24. BENTFELD, M., LÜLLMANN, H., PETER, T., PROPPE, D. (1977):
Interpendence of ion transport and the action of ouabain in heart muscle
Br. J. Pharmacol; 61: 19 - 27
25. BERNSTEIN, J. C., ISREAL, Y. (1976):
Active transport of Rb^{86} in human red cells and rat brain slices
J. Pharmacol. Exp. Ther.; 174: 323 - 329
26. BIEDERT, S., BARRY, W. H., SMITH, T. W. (1979):
Inotropic effects and changes in sodium and calcium contents associated with inhibition of monovalent cation active transport by ouabain in cultured myocardial cells
J. Gen. Physiol; 74: 479 - 494
27. BLOOD, B. E. (1975):
The influence of low doses of ouabain and potassium ions on sheep Purkinje fibre contractility
J. Physiol.; 251: 69 - 70
28. BOEYNAEMS, J. M., DUMONT, J. E. (1977):
The two-step model of ligand-receptor-interaction
Mol. Cell. Endocrin.; 7: 33 - 47
29. BONTING, S. L., HAWKINS, N. M., CANADY, M. R. (1964):
Studies of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase. VII. Inhibition by erythrophleum alkaloids
Biochem. Pharmacol.; 13: 13 - 22
30. BOSSALLER, C., SCHMOLDT, D. (1979):
Dehydro-digitoxosides of digitoxigenin and digoxigenin-binding to beef heart $(Na^{+}K^{+})$ -ATPase in relation to unchanged digitoxosides
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.; 306: 11 - 15

31. BRAUNWALD, E., ROSS, J. jr., SONNENBLICK, E. H. (1980):
in: Harrison's Principles of Internal Medicine (Eds.
ISSELBACHER, K. J., ADAMS, R. A., BRAUNWALD, E., PETERS-
DORF, R. G., WILSON, J. D.) 9th Edn. p 1025, McGraw-Hill,
New York
32. BROWN, L., ERDMANN, E., THOMAS, R. (1983):
Digitalis Structure-Activity-Relationship Analyses: Con-
clusions from Indirect Binding Studies With Cardiac
(Na⁺+K⁺)-ATPase
Biochem. Pharmacol.; 32: 2767 - 2774
33. BROWN, L., ERDMANN, E. (1983):
Binding of dihydrodigitoxin to beef and human cardiac
(Na⁺+K⁺)-ATPase: Evidence for two binding sites in cell
membranes
Biochem. Pharmacol.; 32: 3183 - 3190
34. BROWN, L., THOMAS, R. (1983):
Comparison of the inotropic potencies of some synthetic
and naturally occurring cardiac glycosides using isolated
left atrium of guinea pig
Arzneim. Forsch.; 33: 814 - 817
35. BROWN, L., WERDAN, K., ERDMANN, E. (1983):
Consequences of specific (³H)-ouabain-binding to guinea
pig left atria and cardiac cell membranes
Biochem. Pharmacol.; 32: 423 - 435
36. BROWN, L., ERDMANN, E. (1984):
Binding of Digitalis Derivatives to Beef, Cat and Human
Cardiac (Na⁺+K⁺)-ATPase. Affinity and Kinetic Konstants
Archs. Int. Parmacodyn. Ther.; 271: 229
37. BROWN, L., ERDMANN, E. (1984):
Two binding sites for ouabain in cardiac cell membranes
In: ERDMANN, E. (ed.): Cardiac Glycoside Receptors and
Positive Inotropy - Evidence for more than one receptor?
Suppl. Bas. Res. Cardiol.; 79: 50 - 55
38. BROWN, L., WAGNER, G., HUG, E., ERDMANN, E. (1985):
Ouabain binding and inotropy in acute potassium depletion
in guinea pigs
Cardiovasc. Res. (im Druck)
39. BUSSE, F., LÜLLMANN, H., PETERS, T. (1979):
Concentration dependence of the binding of ouabain to
isolated guinea pig atria
J. Cardiovasc. Pharmacol.; 1: 687 - 698
40. CHANG, K.-L., JACOBS, S., CUATRECASAS, P. (1975):
Quantitative aspects of hormone-receptor-interactions of
high affinity. Effect of receptor concentration and
measurement of dissociation constants of labelled and
unlabelled hormones
Biochim. Biophys. Acta; 406: 294 - 303

41. CHARNOCK, J. S., COOK, D. A., CASEY, R. (1971):
The role of cations and other factors on the apparent energy of activation of (Na^+K^+) -ATPase
Arch. Biochem. Biophys.; 147: 323 - 329
42. CHARNOCK, J. S., COOK, D. A., ALMEIDA, A. F., TO, R. (1973):
Activation energy and phospholipid requirements of membrane bound adenosine triphosphatase
Arch. Biochem. Biophys.; 159: 393 - 399
43. CHARNOCK, J. S., SIMONSON, L. P., ALMEIDA, A. F. (1977):
Variation in sensitivity of the cardiac glycoside receptor characteristics of (Na^+K^+) -ATPase to lipolysis and temperature
Biochim. Biophys. Acta; 465: 77 - 92
44. CLARK, A. J. (1935):
The mode of action of drugs on cells
Williams and Wilkins, Baltimore
45. COHEN, J., DAUT, J., NOBLE, D. (1976):
The influence of extracellular potassium ion on the action of ouabain on membrane currents in sheep purkinje fibers
J. Physiol.; 251: 42 - 43
46. COHEN, J., DAUT, J., NOBLE, D. (1976):
An analysis of the actions of low concentrations of ouabain on membrane currents in Purkinje fibres
J. Physiol.; 260: 75 - 103
47. COHEN, J., FOZZARD, H. A., SHEU, S.-S. (1982):
Increase in intracellular sodium ion activity during stimulation in mammalian cardiac muscle
Circ. Res.; 50: 651
48. CORABOEUF, E., DE LOZE, C., BOISTEL, J. (1953):
Action de la digitale sur les potentiels de membrane et d'action du tissu conductens du coeur de chien etudie a l'aide de microelectrodes intracellulaires
Compt. Rend. Soc. Biol.; 147: 1169 - 1172
49. CRAIG, W. S., KYTE, J. (1980):
Stoichiometry and molecular weight of the minimum asymmetric unit of canine renal sodium and potassium ion-activated adenosine triphosphatase
J. Biol. Chem.; 255: 6262 - 6269
50. CRAIG, W.S. (1982):
Determination of the distribution of sodium and potassium activated adenosine triphosphatase among the various oligomers formed in solutions of nonionic detergents
Biochem.; 21: 2667 - 2674
51. CRANFIELD, P. F. (1975):
The Conduction of the Cardiac Impulse
Mount Kisco, New York: Futura Publishing Co.

52. CUATRECASAS, P., HOLLENBERG, M. D. (1975):
Binding of insulin and other hormones to non-receptor
materials: saturability, specificity and apparent
"negative cooperativity"
Biochem. Biophys. Res. Commun.; 62: 31 - 40
53. DAHLQUIST, F. W. (1978):
The meaning of Scatchard and Hill Plots
Meth. Enzym.; 48: F270 - 299
54. DAVIS, L. D. (1973):
Effect of changes in cycle length on diastolic depolari-
sation produced by ouabain in canine Purkinje fibers
Circ. Res.; 32: 206 - 214
55. DEITMER, J. W., ELLIS, D. (1978):
Comparison of the action of various cardiac glycosides on
the intracellular sodium activity of sheep heart Purkinje
fibres
J. Physiol.; 276: 26P - 27P
56. DE POVER, A., GODFRAIND, T. (1979):
Interaction of ouabain with $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase from human
heart and from guinea-pig heart
Biochem. Pharmacol; 28: 3051 - 3056
57. DE POVER, A., GODFRAIND, T. (1982):
Influence of 16 beta formylation on Na^+, K^+ -ATPase in-
hibition by cardiac glycosides
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.; 321: 135 - 139
58. DETWEILER, D. K. (1976):
Comparative pharmacology of cardiac glycosides
Fed. Proc.; 26: 1119 - 1124
59. DIACONO, J. (1979):
Suggestive evidence for the activation of an electrogenic
sodium pump in stimulated rat atria: apparent discrepancy
between the pump inhibition and the positive inotropic
response induced by ouabain
J. Mol. Cell. Cardiol.; 11: 5 - 30
60. DOERING, W., KÖNIG, E., STURM, W. (1977b):
Digitalisintoxikation: Wertigkeit klinischer und elektro-
kardiographischer Befunde im Vergleich zur Digoxinkon-
zentration im Serum. Teil 1 und 2
Z. Kardiol.; 66: 121 - 137
61. DUTTA, S., MARKS, B. H. (1969):
Factors that regulate ^3H -Ouabain accumulation by the
isolated guinea pig heart
J. Pharmacol. Exp. Ther.; 170: 318 - 325
62. EISNER, D. A., LEDERER, W. A., VAUGHAN-JONES, R. D.
(1984):
The qualitative Relationship between Twitch Tension and
intracellular Sodium Activity in Sheep Cardiac Purkinje
Fibres
J. Physiol.; 355: 251

63. ELLIS, D. (1977):
The effects of external cations and ouabain on the intracellular sodium activity of sheep heart Purkinje fibres
J. Physiol.; 273: 211 - 240
64. ERDMANN, E., SCHONER, W. (1973a):
Ouabain-receptor interaction in $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase preparations from different tissues and species. Determination of kinetic constants and dissociation constants.
Biochim. Biophys. Acta; 307: 386 - 398
65. ERDMANN, E., SCHONER, W. (1973b):
Ouabain-receptor interactions in $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase preparations. III. On the stability of the ouabain receptor against physical treatment, hydrolysis and -SH reagents.
Biochim. Biophys. Acta; 330: 316 - 324
66. ERDMANN, E., SCHONER, W. (1973c):
Ouabain-receptor interactions in $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase preparations. II. Effect of cations and nucleotides on rate constants and dissociation constants
Biochim. Biophys. Acta; 330: 302 - 315
67. ERDMANN, E., SCHONER, W. (1974a):
Ouabain-receptor interactions in $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase preparations. IV. The molecular structure of different cardioactive steroids and other substances and their affinity to the glycoside receptor.
Naunyn Schmiedeberg's Archs. Pharmacol.; 28: 335 - 356
68. ERDMANN, E., SCHONER, W. (1974 b):
Die Affinität verschieden strukturierter Herzglykoside sowie DPH und Ro 2-2985 zum Herzglykosidrezeptor.
Verh. Deutsch. Ges. Kreislaufforsch.; 40: 309 - 314
69. ERDMANN, E., HASSE, W. (1975):
Quantitative aspects of ouabain binding to human erythrocyte and cardiac membranes
J. Physiol.; 251: 671 - 682
70. ERDMANN, E., PRESEK, P., SWOZIL, R. (1976a):
Über den Einfluß von Kalium auf die Bindung von Strophanthin an menschliche Herzmuskelzellmembranen
Klin. Wochenschr.; 54: 383 - 387
71. ERDMANN, E., PATZELT, R., SCHONER, W. (1976 b):
The cardiac glycoside receptor: its properties and its correlation to nucleotide binding sites, phosphointermediate and $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase activity
Rec. Adv. Stud. Cardiac. Struc. Metabol.; 9: 329 - 335
72. ERDMANN, E. (1977):
Cell membrane receptors for cardiac glycosides in the heart
Basic Res. Cardiol.; 72: 315 - 325

73. ERDMANN, E. (1978):
Vergleichende Messungen der Herzglykosid-Rezeptor-Affinität und der Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase durch Digoxin, Digoxin, Methyldigoxin, Strophanthin, Proscillaridin und Meproscillaridin an isolierten menschlichen Herzmuskelzellmembranen
Arzneim. Forsch.; 28: 531 - 535
74. ERDMANN, E. (1978):
Quantitative Aspekte der spezifischen Bindung von Herzglykosiden an Membranrezeptoren
Habilitationsschrift, München
75. ERDMANN, E., PHILIPP, G., SCHOLZ, H. (1980):
Cardiac glycoside receptor, $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase activity and force of contraction in rat heart
Biochem. Pharmacol.; 29: 3219 - 3229
76. ERDMANN, E. (1981):
Influence of cardiac glycosides on their receptor
In: GREEFF, K. (ed.): Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 56/1
Berlin: Springer Verlag, 337 - 380
77. ERDMANN, E., PHILIPP, G., SCHOLZ, H. (1981):
Evidence for two receptors for cardiac glycosides in the heart
In: Cell Membrane Function and Dysfunction of Vascular Tissue; GODFRAIND, T., MEYER, P. (eds.), 77 - 83
Elsevier, North-Holland; Amsterdam, New York, Oxford
78. ERDMANN, E. (1982):
Biochemische Grundlagen der Wirkung von Digitalisglykosiden
Fortsch. i. d. Kardiol; 48: 7 - 18
79. ERDMANN, E. (1983):
Wirkungsmechanismus der Herzglykoside
In: Therapie mit Herzglykosiden; 1 - 7
Springer Verlag; Berlin, Heidelberg, New York
80. ERDMANN, E., BROWN, L. (1983):
The cardiac glycoside-receptor system in the human heart
Eur. Heart J.; 4: 61 - 65 (suppl.)
81. ERDMANN, E., BROWN, L., WERDAN, K. (1984):
Two receptors for cardiac glycosides in the heart
In: ERDMANN, E. (ed.): Cardiac Glycoside Receptors and Positive Inotropy. Evidence for more than one Receptor?
Bas. Res. Cardiol.; 79: 21 - 26 (suppl. A)
82. ERDMANN, E., WERDAN, K., BROWN, L. (1985):
Multiplicity of cardiac glycoside receptors in the heart.
Trends Pharmacol. Sci.; 6: 293 - 295
83. FARLEY, R. A., TRAN, C. M., CARILLI, C. T., HAWKE, D., SHIVELY, J. E. (1984):
The amino acid sequence of a fluorescein-labeled peptide from the active site of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase
J. Biol. Chem.; 259: 9532 - 9535

84. FERRIER, G. R. (1976):
The effect of tension on acetylstrophanthidin induced
transient depolarisation and aftercontractions in canine
myocardial and Purkinje tissue
Circ. Res.; 38: 156 - 162
85. FERRIER, G. R. (1977):
Digitalis arrhythmias: role of oscillatory after-
potentials
Prog. Cardiovasc. Dis.; 19: 459 - 474
86. FISCH, C., STONE, J. M. (1969):
Recognition and treatment of digitalis toxicity
In: Digitalis, 162 - 172
FISCH, C., SURAWICZ, B. (eds),
Grune and Stratton; New York, London
87. FORBUSH, B. III., HOFFMAN, J. F. (1979):
Direct Photoaffinity Labeling of the Primary Region of
the Ouabain Binding Site of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase with (^3H) -
Ouabain, (^3H) -Digitoxin and (^3H) -Digitoxigenin
Biochim. Biophys. Acta; 555: 299 - 306
88. FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W. (1983):
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
Bibliographisches Institut AG, Zürich
Wissenschaftsverlag
89. FRANK, G. B. (1980):
The Current View of the Source of Trigger Calcium in
Excitation - Contraction Coupling in Vertebrate Skeletal
Muscle
Biochem. Pharmacol.; 29: 2399 - 2406
90. FRICKE, U. (1978):
Myocardial activity of inhibitors of the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase:
Differences in the mode of action and subcellular distri-
bution pattern
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.; 303: 197 - 204
91. FRICKE, U. (1984):
Two ouabain binding sites in guinea pig heart $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -
ATPase. Differentiation by sodium and erythrosin B.
In: ERDMANN, E. (ed.): Cardiac Glycoside Receptors and
Positive Inotropy. Evidence for more than one Receptor?
Bas. Res. Cardiol; 79: 119 - 127 (suppl. A)
92. GHYSEL-BURTON, J., GODFRAIND, T. (1975):
Stimulation and inhibition by ouabain of the sodium pump
in guinea pig atria
Br. J. Pharmacol.; 55: 249 P
93. GHYSEL-BURTON, J., GODFRAIND, T. (1979):
Stimulation and inhibition of the sodium pump by cardio-
active steroids in relation to their binding sites and
their inotropic effect on guinea pig isolated atria
Br. J. Pharmacol.; 66: 175 - 184

94. GILFRICH, H. J., SCHÖLMERICH, P. (1975):
Digitalisintoxikation
Dtsch. Med. Wochenschr.; 100: 831 - 838
95. GILLIS, R. A., QUEST, J. A. (1979):
The role of the nervous system in the cardiovascular
effects of digitalis
Pharmacol. Rev.; 31: 19 - 97
96. GLITSCH, H. G., REUTER, H., SCHOLZ, H. (1970):
The Effect of Internal Sodium Concentration on Calcium
Fluxes in Isolated guinea Pig Auricles
J. Phys.; 209: 25 - 43
97. GLYNN, J. M. (1969):
in: Digitalis, p 30
FINCH, C., SURAWICZ, B. (eds.)
Grune and Stratton; New York
98. GLYNN, J. M., KARLISH, S. J. D. (1975):
The Sodium Pump
Ann. Rev. Physiol.; 37: 13 - 95
99. GODFRAIND, T. (1975):
Cardiac glycoside receptor in the heart
Biochem. Pharmacol.; 24: 823 - 827
100. GODFRAIND, T., GHYSEL-BURTON, J. (1977):
Binding sites related to ouabain-induced stimulation or
inhibition of the sodium pump
Nature; 265: 165 - 166
101. GODFRAIND, T., GHYSEL-BURTON, J. (1978):
The action of digoxin and digoxigenin-monodigitoxoside on
the sodium pump and on the contractility in isolated
guinea pig atria
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.; 234: 340 - 341
102. GODFRAIND, T., GHYSEL-BURTON, J. (1980):
Independence of the positive inotropic effect of ouabain
from the inhibition of the heart ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-pump
Proc. Natl. Acad. Sci.; 77: 3067 - 3069
103. GODFRAIND, T., DE POVER, A., LUTETE, D.-N. (1980):
Identification with potassium and vanadate of two classes
of specific ouabain binding sites in a ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase
preparation from the guinea pig heart
Biochem. Pharmacol.; 29: 1195 - 1199
104. GODFRAIND, T. (1984):
Subclassification of cardiac glycoside receptors
In: ERDMANN, E. (ed.): Cardiac Glycoside Receptors and
Positive Inotropy. Evidence for more than one Receptor?
Bas. Res. Cardiol.; 79: 27 - 34 (suppl. A)
105. GOSHIMA, K., WAKABAYASHI, S. (1981):
Involvement of an $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{++}$ -Exchange System in Genesis of
Ouabain Induced Arrhythmias of Cultured Myocardial Cells
J. Mol. Cell. Cardiol.; 13: 489 - 509

106. GREEFF, K., SCHADEWALDT, H. (1981):
Introduction and Remarks on the History of Cardiac Glycosides
In: GREEFF, K. (ed.): Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 56/1; 1-12
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
107. GREEFF, K., HAFNER, D. (1981):
Evaluation of cardiac glycosides in isolated heart preparations other than papillary muscle
In: GREEFF, K. (ed.): Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 65/1; 161
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
108. GRISHAM, C. M., BARNETT, R. E. (1973):
The role of lipid-phase transitions in the regulation of the sodium and potassium adenosine triphosphatase.
Biochem.; 12: 2635 - 2637
109. GÜNTERT, T. W., LINDE, H. H. A. (1981):
Chemistry and Structure-Activity-Relationships of Cardioactive Steroids
In: GREEFF, K. (ed.): Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 56/1; 13 - 26
Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York
110. HAASIS, R., LARBIG, D., STUNKAT, R., BADER, H., SEBOLDT, H. (1977):
Radioimmunologische Bestimmung der Glykosidkonzentration im menschlichen Gewebe
Klin. Wochenschr.; 55: 23 - 30
111. HALDANE, J. B. (1957):
Graphical methods in enzyme chemistry
Nature; 179: 832
112. HAMMERMAN, H., HERNANDEZ, A., GOLDRING, D. (1971):
The uptake of ^3H -digoxin by the bundle of His and the myocardium
J. Lab. Clin. Med.; 78: 799
113. HAN, E. S., TOBIN, T., BRODY, T. M. (1976):
Effects of alkali metal ions on phosphate-enzyme levels and ^3H -ouabain binding to $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase
Biochim. Biophys. Acta; 429: 993 - 1005
114. HANSEN, O. (1971):
The relationship between g-Strophanthin-binding capacity and ATPase activity in plasma-membrane-fragments from ox brain
Biochim. Biophys. Acta; 233: 122 - 132
115. HANSEN, O., SKOU, J. C. (1973):
A study on the influence of the concentration of Mg^{2+} , P_i , K^+ , Na^+ and tris on $(\text{Mg}^{2+} + \text{P}_i)$ -supported g-strophanthin binding to $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -activated ATPase from ox brain
Biochim. Biophys. Acta 1311: 51 - 56

116. HART, G., NOBLE, D., SHIMONI, Y. (1983):
The effect of low concentrations of cardiotonic steroids
on membrane currents and tension in sheep Purkinje-fibres
J. Physiol.; 334: 103 - 131
117. HAUSTEIN, K. O., MARKWARDT, F., REPKE, K. R. H. (1970):
Different Relationship between Therapeutic and Toxic
Actions of 16Epi-Gitoxin, Gitoxin and Ouabain on Isolated
Cardiac Preparations
Eur. J. Pharmacol.; 10: 1 - 10
118. HAUSTEIN, K. O., HAUPTMANN, J. (1974):
Studies on cardioactive steroids:
II. Structure-Activity Relationships in the Isolated
Guinea Pig
Pharmacol.; 11: 129 - 138
119. HAUSTEIN, K. O. (1977):
Extraordinary cardiac effects of 16 epi-Gitoxin in com-
parison to Ouabain in cats and dogs
Pharmacol.; 15: 178 - 190
120. HAUSTEIN, K. O., GLUSA, E. (1980):
Studies on cardioactive steroids:
V. Structure-Activity Relationships of Derivatives of 16
epi-Gitoxin
Pharmacol.; 21: 375 - 382
121. HAUSTEIN, K. O. (1983):
Digitalis
Pharmacol. Ther.; 18: 1 - 86
122. HERZIG, J. W., FEILE, K., RÜEGG, J. C. (1981):
Activating effects of AR-L 115BS on the Ca^{2+} -sensitive
force, stiffness and unloaded shortening velocity (V_{max})
in isolated contractile structures from mammalian heart
muscle
Drug Res.; 31: 188 - 191
123. HILL, A. V. (1910):
J. Physiol.; 40: 4 - 7
124. HOFFMAN, B. F., SINGER, D. H. (1964):
Effects of digitalis on electrical activity of cardiac
fibres
Prog. Cardiovasc. Dis.; 7: 226 - 260
125. HOKIN, L. E. (1974):
Purification and properties of the sodium and potassium
activated adenosine triphosphatase and reconstitution of
sodium transport
Ann. N. Y. Acad. Sci.; 242: 12 - 23
126. HOLLANDER, P. B. (1975):
Differential sensitivities of Purkinje fibres and ventri-
cular myocardium to ouabain toxicity
J. Clin. Pharmacol.; 15: 560

127. HOLLEMANS, H. J. G., BERTINA, R. M. (1975):
Scatchard plot and heterogeneity in binding affinity of
labeled and unlabeled ligands
Clin. Chem.; 21: 1769 - 1773
128. HOPKINS, B. E., WAGNER, H., SMITH, T. W. (1976):
Sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase
of the nasal salt gland of the duck (*anas platyrhynchos*)
J. Biol. Chem.; 25: 4365 - 4371
129. JACOBSEN, A. L. (1968):
Effect of ouabain on the ATPase of cardiac myosin B at
high ionic strength
Circ. Res.; 22: 625 - 632
130. JAMES, T. N., SHERF, L. (1968):
Ultrastructure of myocardial cells
Am. J. Cardiol.; 22: 389 - 416
131. JAMES, T. N., SHERF, L., SCHLANT, R. C., SILVERMAN, M. E.
(1982):
In: The Heart, Arteries and Veins, 5th Ed., p 22
J. W. Hurst (ed.)
McGraw-Hill, New York
132. JANUARY, C. T., FOZZARD, T. (1984):
The effects of membrane potential, extracellular potassium
and tetrodotoxin on the intracellular sodium ion activity
of sheep cardiac muscle
Circ. Res.; 54: 652 - 665
133. JENSEN, J., NØRBY, J. G. (1971):
On the specificity of the ATP-binding site of ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-
activated ATPase from brain microsomes
Biochim. Biophys. Acta; 233: 395
134. JØRGENSEN, A. V., SØRENSEN, O. M. (1970):
Digitalis intoxication. A comparative study on the in-
cidence of digitalis intoxication during periods 1950 -
52 and 1964 - 66
Acta med. Scand.; 188: 179 - 183
135. JØRGENSEN, P. L. (1975):
Isolation and characterization of the components of the
sodium pump
Quart. Rev. Biophys.; 7: 239 - 274
136. JØRGENSEN, P. L. (1981):
Mechanism of the Na^+, K^+ -pump. Proteinstructure and con-
formation of the pure ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase
Biochim. Biophys. Acta; 694: 27 - 68
137. KAISER, R., GOTTSCHALK, G. (1972):
Elementare Tests zur Beurteilung von Meßdaten
HTB, Bd. 77; Bibliograph. Inst., Mannheim
B.I.-Wissenschaftsverlag

138. KASS, R. S., LEDERER, W. J., TSIEN, R. W., WEINGART, R. (1978):
Role of calcium ions in transient inward currents and aftercontractions induced by strophanthidin in cardiac Purkinjefibers
J. Phys.; 281: 187 - 208
139. KASSEBAUM, D. G. (1963):
Electrophysiological effects of strophanthin in the heart
J. Pharm. Exp. Ther.; 140: 329 - 338
140. KEIGHTLEY, D. D., CRESSIE, N. A. C. (1980):
The Woolf plot is more reliable than the Scatchard plot in analysing data from hormone receptor assays
J. steroid. Biochem.; 13: 1317 - 1323
141. KEIGHTLEY, D. D., FISHER, R. J., CRESSIE, N. A. C. (1983):
Properties and Interpretation of the Woolf and Scatchard Plots in Analysing Data from Steroid Receptor Assays
J. steroid. Biochem.; 19: 1407 - 1412
142. KIMELBERG, H. K., PAPAHAZDOPOULOS, D. (1972):
Phospholipid requirement for $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase activity
Biochim. Biophys. Acta; 282: 277
143. KLONER, R. A. (ed.) (1984):
The Guide to Cardiology
John Wileys and Sons, New York
144. KU, D. T., AKERA, T., PEW, C. L., BRODY, T. M. (1974):
Cardiac glycosides: correlations among Na^+ , K^+ -ATPase, sodium pump and contractility in the guinea pig heart
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.; 285: 185 - 200
145. KÜBLER, W., ENDRES, G., SMEKAL, P. V. (1970):
Vergleichende Untersuchungen über die Aktivität und Digitalisempfindlichkeit der Transport-ATPase im Arbeitsmyokard und im Reizleitungssystem
Verh. Dtsch. Ges. Kreislaufforsch.; 36: 305
146. KÜBLER, W., SMEKAL, P. V. (1975):
Comparative studies on the Na^+ , K^+ -ATPase-activity and digitalis-sensitivity in the nodal tissue and the myocardium
Acta cardiol.; 17: 103 - 113 (suppl.)
147. KYTE, J. (1972):
The titration of the cardiac glycoside binding site of the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -adenosine triphosphatase
J. Biol. Chem.; 247: 7634 - 7641
148. KYTE, J. (1972):
Properties of the two polypeptides of sodium- and potassium-dependent adenosine triphosphatase
J. Biol. Chem.; 247: 7642 - 7649

149. KYTE, J. (1975):
Structural studies of sodium- and potassium-activated
adenosine triphosphatase
J. Biol. Chem.; 250: 7443 - 7449
150. KYTE, J. (1981):
Molecular considerations relevant to the mechanism of
active transport
Nature; 292: 201 - 204
151. LADO, M. G., SHEU, S.-S., FOZZARD, H. A. (1984):
Effects of toxicity on tension and intracellular sodium
and calcium activities in sheep heart
Circ. Res.; 54: 576 - 584
152. LADURON, P. (1983):
More binding, more fancy
Trends Pharmacol. Sci.; 3: 331 - 334
153. LANE, L. K., COPENHAVER, J. H., LINDENMAYER, G. E.,
SCHWARTZ, A. (1973):
Purification and characterization of ³H-ouabain binding
to the transport adenosine triphosphatase from outer
medulla of canine kidney
J. Biol. Chem.; 248: 7197 - 7200
154. LANGER, G. A., SERENA, S. D. (1970):
Effects of Strophanthidin upon Contraction and Ion Ex-
change in Rabbit Ventricular Myocardium: Relation to
Control of Active State
J. Mol. Cell. Cardiol.; 1: 65 - 90
155. LANGER, G. A. (1980):
The Role of Calcium in the Control of Myocardial Con-
tractility
J. Mol. Cell. Cardiol.; 12: 231 - 239
156. LANGER, G. A. (1981):
Mechanism of Action of Cardiac Glycosides on the Heart
Biochem. Pharmacol.; 30: 3061 - 3064
157. LARBIG, D., HAASIS, R., KOCHSIEK, K. (1978):
Die Glykosidkonzentration und ihre klinische Bedeutung
Forum Cardiologicum, Nr. 15
Boehringer, Mannheim
158. LECHAT, P., MALLOY, C. R., SMITH, T. W. (1983):
Active Transport and Inotropic State in Guinea Pig Left
Atrium
Circ. Res.; 52: 411 - 422
159. LEE, CH. O., KANG, D. H., SOKOL, J. H., LEE, D. S. (1980):
Relation between intracellular Na-Ion Activity and Tension
of sheep cardiac Purkinje fibres exposed to Dihydro-ouabain
Biophys. J.; 29: 315 - 330

160. LEE, C. O., DAGOSTINO, M. (1982):
Effect of strophanthidin on intracellular Na ion activity
and twitch tension of constantly driven canine cardiac
Purkinje fibres
Biophys. J.; 40: 185 - 198
161. LEE, K. S., YU, D. H. (1963):
A study of the sodium-potassium-activated adenosine
triphosphatase activity of heart microsomal fraction
Biochem. Pharmacol.; 12: 1254 - 1264
162. LELY, A., VAN ENTER, C. (1970):
Large-scale digitoxin
Br. Med. J.; 3: 737 - 740
163. LI, T., VASSALLE, M. (1983):
Sodium-calcium exchange in Purkinje fibers: electrical
and mechanical effects
Bas. Res. Cardiol.; 78: 396 - 414
164. LIANG, S. M., WINTER, C. G. (1977):
Digitoxin-induced changes in the subunit-arrangement in
relation to some in vitro activities of the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -
ATPase
J. Biol. Chem.; 252: 8278 - 8284
165. LINDIG, C., REPKE, K. (1967):
Verfahren zur Herstellung von 16 α -Hydroxysteroiden der
Cardenolidreihe
DDR-Patentschrift, Wirtschaftspatent Wp 126/128735
166. LINEWEAVER, H., BURK, D. (1934):
J. Amer. Chem. Soc.; 56: 658 - 666
zitiert in: BURK, D. (1984):
Enzyme kinetic constants: the double reciprocal plot.
Trends Pharmacol. Sci.; 50: 202 - 204
167. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R.
J. (1951):
Protein measurement with the Folin phenol reagent
J. Biol. Chem.; 193: 265 - 275
168. LÜLLMANN, H., PETERS, T. (1973):
Studies on the side of action of cardiac glycosides
Symposium on Digitalis, Oslo; 125 - 131
Gyldendal Norsk Forlag, Oslo, Norway
169. LÜLLMANN, H., PETERS, T. (1981):
Influence of cardiac glycosides on cell membranes
In: Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 56/1
GREEFF, K. (ed.); 395 - 404
Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York
170. MAC LENNAN, D. H., BRANDL, C. J., KORCZAK, B., GREEN, N.
M. (1985):
Amino acid sequence of a $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ -dependent ATPase from
rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its
complementary DNA sequence
Natur; 316: 696 - 700

171. MARBAN, E., TSIEN, R. W. (1982):
Enhancement of Calcium Current During Digitalis Inotropy
in Mammalian Heart: Positive Feed-Back Regulation by
Intracellular Calcium?
J. Physiol.; 329: 589 - 595
172. MARSHALL, P. G. (1970):
in: Rodd's Chemistry of carbon compounds. Vol. IID, 2nd
Ed., 360 - 420
S. Coffey, Elsevia, Amsterdam
173. MASON, D. T., FOERSTER, J. M. (1981):
Side Effects and Intoxication of Cardiac Glycosides:
Manifestation and Treatment
In: GREEFF, K. (ed.): Handbook of Experimental Pharma-
cology, vol 56/1; 275 - 297
Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York
174. MATSUI, H., SCHWARTZ, A. (1967):
ATP-dependent Binding of ³H-Digoxin to a (Na⁺+K⁺)-ATPase
from cardiac muscle
Fed. Proc.; 26: 398
175. MATSUI, H., SCHWARTZ, A. (1968):
Mechanism of cardiac glycoside inhibition of the (Na⁺+
K⁺)-ATPase from cardiac tissue
Biochim. Biophys. Acta; 151: 655 - 663
176. McCubbin, W. D., KAY, C. M. (1980):
Calcium induced conformational changes in the troponin-
tropomyosin-complexes of skeletal and cardiac muscle and
their roles in the regulation of contraction-relaxation
Acc. Chem. Res.; 13: 185 - 192
177. MEINERTZ, T., NAWRATH, H., SCHOLZ, H. (1976):
Possible role of cyclic AMP in the relaxation process of
mammalian hearts; effects of dibutyryl cyclic AMP and
theophyllin on potassium contractures in cat papillary
muscles
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.; 293: 129 - 137
178. MICHAEL, L. H., SCHWARTZ, A., WALLICK, E. T. (1979):
Nature of the transport adenosine-triphosphatase-digi-
talis-complex:
XIV, Inotropy and cardiac glycoside interaction with
(Na⁺+K⁺)-ATPase of isolated cat papillary muscles
Mol. Pharmacol.; 16: 136 - 146
179. MOE, G. K., MENDEZ, R. (1951):
The action of several glycosides on conduction velocity
and ventricular excitability in the dog heart
Circ.; 4: 729 - 734
180. MOE, G. K., FARAH, A. E. (1975):
Digitalis and allied cardiac glycosides
In: GOODMAN, L. S., GILMAN, A. (eds.):
The pharmacological basis of therapeutics, 5th Ed.; 661
MacMillan, New York

181. MÜLLER, P. (1965):
Ouabain Effects on Cardiac Contraction, Action Potential
and Cellular Potassium
Circ. Res.; 17: 46 - 56
182. MURTHY, R. V., KIDWAY, A. M., DANIEL, E. E. (1974):
Dissociation of contractile effect and binding and in-
hibition of (Na^+K^+) -ATPase by cardiac glycosides in
rabbit myometrium
J. Pharmacol. Exp. Ther.; 188: 575 - 581
183. NOBLE, D. (1980):
Mechanism of action of therapeutic levels of cardiac
glycosides
Cardiovasc. Res.; 14: 495 - 514
184. NOWAK, G., HAUSTEIN, K. O. (1976):
Different toxic effects of ouabain and 16 α -gitoxin on
Purkinje fibres and ventricular muscle fibres
Pharmacol.; 14: 256 - 264
185. OKITA, G. T. (1975):
Dissociation of the positive inotropic effects from the
cardiotoxic effects of digitalis
Prox. West. Pharmacol. Soc.; 18: 14 - 19
186. OKITA, G. T. (1977):
Dissociation of (Na^+K^+) -ATPase inhibition from digitalis
inotropy
Fed. Proc.; 36: 2225 - 2230
187. PALFI, F. J., BESCH, H. R. jr., WATANABE, A. M. (1978):
Ouabain Sensitivity of the (Na^+K^+) -ATPase Activity from
Single Bovine Cardiac Purkinje Fiber and Adjacent Papil-
lary Muscle
J. Mol. Cell. Cardiol.; 10: 1149
188. PETERS, T., RABEN, R.-H., WASSERMANN, O. (1974):
Evidence for a dissociation between positive inotropic
effects and inhibition of the (Na^+K^+) -ATPase by ouabain,
cassaine and their alkylating derivatives
Eur. J. Pharmacol.; 26: 166 - 174
189. PETERSON, E. L., HOKIN, H. E. (1981):
Molecular weight and stoichiometry of the sodium- and
potassium-activated adenosine triphosphatase subunits
J. Biol. Chem.; 256: 3751 - 3761
190. PHILIPP, G. (1980):
Spezifische Herzglykosidrezeptoren: Bindungsstudien mit
(3H)-g-Strophanthin an verschiedenen Organen und Zell-
membranen der Ratte und des Meerschweinchens
Dissertation, München
191. PITTS, B. J., LANE, L. K., SCHWARTZ, A. (1973):
Nature of the transport ATPase-digitalis-complex. VI.
Purification of and ouabain binding to a highly active
cardiac Na^+K^+ -ATPase
Biochem. Biophys. Res. Commun.; 53: 1060 - 1066

192. POLIMENI, P. J., VASSALLE, M. (1970):
Potassium fluxes in Purkinje and ventricular muscle
fibres during rest and activity
Amer. J. Physiol.; 218: 1381 - 1388
193. POLIMENI, P. J., VASSALLE, M. (1971):
On the mechanism of ouabain toxicity in Purkinje and
ventricular muscle fibres at rest and during activity
Amer. J. Physiol.; 221: 622 - 629
194. POLIMENI, P. J. (1974):
Extracellular space and ionic distribution in rat ventricle
Amer. J. Physiol.; 227: 676 - 683
195. POST, R. L., SEN, A. K. (1967):
Sodium- and potassium-stimulated ATPase
In: COLOWICK, S. P., KAPLAN, N. O. (eds.):
Methods in Enzymology, X; 762 - 768
Academic Press, New York
196. PRESEK, P. (1982):
Spezifische Herzglykosidrezeptoren:
Quantitative Aspekte der Bindung von g-Strophanthin an
Zellmembranpräparationen verschiedener, menschlicher
Gewebe
Dissertation, München
197. REIMANN, E. M., SOLOFF, M. S. (1978):
The effects of radioactive contaminants on the estimation
of binding parameters by Scatchard analysis
Biochim. Biophys. Acta; 533: 130 - 139
198. REITER, M. (1981):
The use of the isolated papillary muscle for the evaluation
of positive inotropic effects of cardioactive
steroids
In: GREEFF, K. (ed.):
Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 56/1; 153 -
160
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
199. REPKE, K., PORTIUS, H. J. (1963):
Über die Identität der Ionenpumpen-ATPase in der Zell-
membran des Herzmuskels mit einem Digitalis-Rezeptorenzym
Experientia; 19: 452 - 458
200. REPKE, K. (1964):
Metabolism of cardiac glycosides. New aspects of cardiac
glycosides III.; 47 - 73
Pergamon Press, Oxford
201. REPKE, K., SCHÖNFELD, W. (1984):
 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase as the digitalis receptor
Trends Pharmacol. Sci.; 5: 393 - 397
202. REUTER, H. (1974):
Exchange of Calcium Ions in the Mammalian Myocardium
Circ. Res.; 34: 599 - 605

203. RHEE, H. M. (1981):
Accumulation of (^3H)-Ouabain in functionally different
Canine Cardiac Tissues: Differential Rb^+ -Uptake
Br. J. Pharmacol.; 73: 81 - 86
204. RHEE, H. M., HUANG, W.-H., ASKARI, A. (1981):
Relationship between the positive inotropic action of
ouabain and its inhibitory effects on Na^+, K^+ -ATPase and
active transport of Rb^+ in the dog heart
Eur. J. Pharmacol.; 70: 273 - 278
205. RHEE, H. M. (1982):
Ouabain Sensitivity of Rb^+ -Uptake in Canine Purkinje
Fibers and Ventricular Muscle
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.; 318: 344 - 348
206. RIECKER, G. (1982):
Therapie der chronischen Herzinsuffizienz
In: Klinische Kardiologie; 611 - 624
Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York
207. RIETBROCK, N., WOODCOCK, B. G. (1981):
On the rational choice of cardiac glycosides
Trends Pharmacol. Sci.; 2: 206 - 208
208. RODBARD, D., MUNSON, D. J., THAKUR, A. K. (1980):
Quantitative characterization of hormone receptors
Cancer; 46: 2907 - 2918
209. ROSEN, M. R., GELBAND, H., MERKER, C., HOFFMAN, B. F.
(1973):
Mechanism of digitalis toxicity: effects of ouabain on
phase four of canine Purkinje fiber transmembrane poten-
tials
Cir.; 47: 681 - 689
210. ROSEN, M. R., GELBAND, H., HOFFMAN, B. F. (1973a):
Correlation between effects of ouabain on the canine
electrocardiogram and transmembrane potentials of iso-
lated Purkinje Fibers
Circ.; 47: 65 - 72
211. ROSEN, M. R., WIT, A. L., HOFFMAN, B. F. (1975):
Electrophysiology and pharmacology of cardiac arrhythmias.
IV. Cardiac antiarrhythmic and toxic effects of digitalis
Amer. Heart J.; 89: 391 - 399
212. RUOHO, A., KYTE, J. (1974):
Photoaffinity-labelling of the ouabain binding site on
($\text{Na}^+ \text{K}^+$)-ATPase
Proc. Natl. Acad. Sci.; 71: 2352 - 2356
213. SCAF, A. H. J. (1975):
Cooperativity in classical receptor theory
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.; 215: 4 - 12
214. SCATCHARD, G. (1949):
The attractions of proteins for small molecules and ions
Ann. N. Y. Acad. Sci.; 51: 660 - 672

215. SCHAMROTH, L., YOSHONIS, K. F. (1969):
Mechanisms in reciprocal rhythm
Amer. J. Cardiol.; 24: 224 - 233
216. SCHATZMANN, H. J. (1953):
Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium- und
Natriumtransport durch die Erythrozytenmembran
Helv. Physiol. Acta; 11: 346 - 453
217. SCHONER, W., ILLBERG, C., KRAMER, R., SEUBERT, W. (1967):
On the mechanism of Na^+ and K^+ -stimulated hydrolysis of
ATP.
I. Purification and properties of a Na^+ and K^+ -activated
ATPase from ox brain
Eur. J. Biochem.; 3: 134
218. SCHWARTZ, A., MATSUI, H., LAUGHTER, A. H. (1968):
Tritiated Digoxin Bindung to $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -Activated Adenosine
Triphosphatase: Possible allosteric site
Science; 160: 323
219. SCHWARTZ, A., LINDENMAYER, G. E., ALLEN, J. C. (1975):
The sodium-potassium adenosine triphosphatase: Pharma-
cological, physiological and biochemical aspects
Pharmacol. Rev.; 27: 3 - 134
220. SCHWARTZ, A. (1976a):
Is the cell membrane Na^+, K^+ -ATPase enzyme system the
pharmacological receptor for digitalis?
Circ. Res.; 39: 2 - 7
221. SEN, A. K., TOBIN, T., POST, R. L. (1969):
A cycle for ouabain-inhibition of sodium- and potassium-
dependent adenosine triphosphatase
J. Biol. Chem.; 244: 6596 - 6604
222. SHARMA, V. K., POTTICK, L. A., BANARJEE, S. P. (1980):
Ouabain stimulation of noradrenalin transport in guinea
pig heart
Nature; 286: 817 - 819
223. SHERF, L., JAMES, T. N. (1979):
Fine structure of cells and their histologic organisation
within internodal pathways of the heart: clinical and
electrocardiographic implication
Amer. J. Cardiol.; 44: 345 - 370
224. SHULL, G. E., SCHWARTZ, A., LINGREL, J. B. (1985):
Amino-acid sequence of the catalytic subunit of the
 $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase deduced from a complementary DNA
Nature; 316: 691 - 695
225. SINGER, S., CONRAD, M. (1981):
The structure of cell membranes
In: Cell Membrane Function and Dysfunction of Vascular
Tissue; 1 - 12
GODFRAIND, T., MEYER, P. (eds.)
Elsevier, North-Holland

226. SKOU, J. C. (1957):
The Influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves
Biochim. Biophys. Acta; 23: 349 - 401
227. SMITH, T. W., HABER, E. (1970):
Digoxin Intoxication: The Relationship of Clinical Presentation to Serum Digoxin Concentration
J. Clin. Invest.; 49: 2377 - 2386
228. SMITH, T. W., ANTMAN, E. M., FRIEDMAN, P. L., BLATT, C. M., MARSH, J. D. (1984):
Digitalis Glycosides: Mechanism and Manifestation of Toxicity. I - III
Progr. Cardiovasc. Dis.; 26: 413 - 441 (I), 26: 495 - 523 (II), 27: 21 - 56 (III)
229. SMYTHIES, J. R., BRADLEY, R. J. (1978):
Receptors in Pharmacology
Marcel Dekker; New York, Basel
230. SODEMAN, W. A. (1965):
Diagnosis and Treatment of Digitalis Toxicity
N. Engl. J. Med.; 273: 35 - 93
231. SOMBERG, J. C., BARRY, W. H., SMITH, T. W. (1981):
Differing Sensitivities of Purkinje Fibers and Myocardium to Inhibition of monovalent Cation Transport by Digitalis
J. Clin. Invest.; 67: 116 - 123
232. SOMBERG, J. C., KNOX, S. M., MIURA, D. S. (1983):
Effect of quinidine on differing sensitivities of Purkinje Fibers and Myocardium to Inhibition of Monovalent Cation Transport by Digitalis in Dogs
Amer. J. Cardiol.; 52: 1123 - 1126
233. STEKHOVEN, F. S., BONTING, S. L. (1981):
Transport adenosine triphosphatase: Properties and functions
Physiol. Rev.; 61: 1 - 76
234. SWAIN, H. H., WEIDNER, C. L. (1957):
A study of substances which alter intraventricular conduction in isolated dog heart
J. Pharmacol. Exp. Ther.; 120: 137 - 146
235. SWEADNER, K. J. (1979):
Two molecular forms of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -stimulated ATPase in brain
J. Biol. Chem.; 254: 6060 - 6067
236. SWEADNER, K. J., GOLDIN, S. M. (1980):
Active transport of Sodium and Potassium Ions
N. Engl. J. Med.; 302: 777 - 783

237. TAMM, CH. (1961):
The Stereochemistry of the Glycosides in Relation to
Biological Activity
In: Proceedings of the first international Pharmacological
Meeting Stockholm; 3: 11 - 26
WILBRANDT, W., LINDGREN, P. (eds.);
Pergamon Press, Oxford
238. TANIGUCHI, K., IIDA, S. (1972a):
The effect of phospholipids in the apparent activation
energy of (Na^+K^+) -ATPase
Biochim. Biophys. Acta; 274: 536 - 541
239. TANIGUCHI, K., IIDA, S. (1972b):
Two apparently different ouabain-binding sites of (Na^+K^+) -ATPase
Biochim. Biophys. Acta; 288: 98 - 102
240. TANIGUCHI, K., IIDA, S. (1973):
The role of phospholipids in the binding of ouabain to
sodium and potassium adenosine triphosphatase
Mol. Pharmacol.; 9: 350 - 359
241. TAWARA, S. (1906):
Über die sogenannten abnormen Sehnenfäden des Herzens:
Ein Beitrag zur Pathologie des Reizleitungssystems des
Herzens
Beitr. z. pathol. Anatomie; 23: 563 - 584
242. TEN EICK, R. E., BASSETT, A. L., OKITA, G. T. (1973):
Dissociation of electrophysiological and inotropic
actions of strophanthidin-3-bromo-acetate: possible role
of adenosine triphosphatase in the maintenance of the
myocardial transmembrane Na^+ and K^+ gradients
J. Pharmacol. Exp. Ther.; 185: 12 - 23
243. TOBIN, T., BRODY, T. M. (1972):
Rates of Dissociation of enzyme-ouabain-complexes and
 $K_{0.5}$ -values in (Na^+K^+) -ATPase from different species
Biochem. Pharmacol.; 21: 1553 - 1560
244. TOBIN, T., HENDERSON, R., SEN, A. K. (1972):
Species and tissue differences in the rate of disso-
ciation of ouabain from (Na^+K^+) -ATPase
Biochim. Biophys. Acta; 274: 551 - 555
245. VASSALLE, M., KARIS, J., HOFFMAN, B. F. (1962):
Toxic effects of ouabain on Purkinje-fibres and ventri-
cular muscle fibres
Amer. J. Physiol. 203: 433 - 439
246. VASSALLE, M., MUSSO, E. (1976):
On the mechanism underlying digitalis toxicity in cardiac
Purkinje fibers
Rec. Adv. Stud. Card. Ster. Metab.; 9: 355 - 376

247. VASSALLE, M., LIN, C. J. (1979):
Effect of calcium on strophanthidin-induced electrical and mechanical toxicity in cardiac Purkinje fibers
Amer. J. Physiol.; 236: H689 - H698
248. VASSALLE, M., BHATTACHARYYA, M. (1980):
Local Anesthetics and the Role of Sodium in the Force Development by Canine Ventricular Muscle and Purkinje Fibers
Circ. Res.; 47: 666 - 674
249. VASSALLE, M., LEE, C. O. (1984):
The relationship among intracellular sodium activity, calcium and Strophanthidin inotropy in canine cardiac Purkinje fibers
J. Gen. Physiol.; 83 (2): 287 - 307
250. VICK, R. L., CHANG, D. C., NICHOLS, B. L., HAZELWOOD, C. F., HARVEY, M. C. (1973):
Sodium, potassium and water in cardiac tissues
Ann. N. Y. Acad. Sci.; 204: 575 - 606
251. WAGNER, G. (1985):
Herzglykosidrezeptoren bei Hypokaliämie. Bindungsstudien mit ³H-g-Strophanthin an Erythrozyten, Herz- und Skelettmuskeln von Meerschweinchen
Dissertation, München
252. WALLICK, E. T., SCHWARTZ, A. (1974):
Thermodynamics of the Rate of Binding of Ouabain to the Sodium, Potassium-Adenosine Triphosphatase
J. Biol. Chem.; 249: 5141 - 5147
253. WALLICK, E. T., LANE, L. K., SCHWARTZ, A. (1979):
Biochemical Mechanism of the Sodium Pump
Ann. Rev. Physiol.; 41: 397 - 411
254. WALLICK, E. T., KIRLEY, T. L., SCHWARTZ, A. (1985):
Structural studies on the cardiac glycoside receptor
Vortrag auf dem "Symposium Cardiac Glycosides, 1785 - 1985", München, Okt. 1985.
Im Druck
255. WASER, P. G., VOLKART, O. (1954):
Wirkung von Herzglykosiden auf Actomyosin
Helv. Physiol. Acta; 12: 12 - 22
256. WASSERSTROM, J. A., SCHWARTZ, D. J., FOZZARD, H. A. (1982):
Catecholamine effects on intracellular sodium activity and tension in dog heart
Amer. J. Physiol.; 243: H670 - 675
257. WASSERSTROM, J. A., SCHWARTZ, D. J., FOZZARD, H. A. (1983):
Relation between intracellular sodium and twitch tension in sheep cardiac Purkinje strands exposed to cardiac glycosides
Circ. Res.; 52: 697 - 705

258. WEILAND, G. A., MOLINOFF, P. B. (1981):
Quantitative Analysis of Drug-Receptor Interactions:
I. Determination of Kinetic and Equilibrium Properties
Life Sci.; 29: 313 - 330
259. WEINGART, R., HESS, P. (1984):
Free calcium in sheep cardiac tissue and frog skeletal
muscle measured with Ca^{2+} -selective microelectrodes
Pflüger's Arch.; 402: 1 - 9
260. WERDAN, K. (1984):
Herzglykosidrezeptoren der intakten Herzmuskelzelle-
Eigenschaften und deren experimentelle Beeinflussung
Habilitationsschrift, München
261. WERDAN, K., WAGENKNECHT, B., ZWISLER, B., BROWN, L.,
KRAWIETZ, W., ERDMANN, E. (1984):
Cardiac glycoside receptors in cultured heart cells. I.
Characterization of one single class of high affinity
receptors in heart muscle cells from chicken embryos
Biochem. Pharmacol.; 33/7: 1161 - 1164
262. WHITTAM, R. CHIPPERFIELD, A. R. (1973):
Ouabain binding to the sodium pump in plasma membranes
isolated from ox brain
Biochim. Biophys. Acta; 307: 563 - 577
263. WITHERING, W. (1785):
An account of the foxglove and some of its medical uses:
With practical remarks on dropsy and other diseases
Birmingham
264. YAMAMOTO, S., AKERA, T., BRODY, T. M. (1979):
Sodium Influx Rate and Ouabain-sensitive Rubidium Uptake
in Isolated Guinea Pig Heart Atria
Biochim. Biophys. Acta; 555: 270 - 284
265. YODA, A., HOKIN, L. E. (1970):
On the reversibility of binding of cardiotonic steroids
to a partially purified $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -dependent adenosine
triphosphatase from beef brain
Biochem. Biophys. Res. Commun.; 40: 880 - 886
266. ZAMPIGHI, G., KYTE, J., FREYTAG, W. (1984):
Structural Organisation of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase in Purified
Membranes
J. Cell. Biol.; 98: 1851 - 1864

7. LEBENS LAUF

Geburt am 2.10.1959 in München als drittes Kind des Dr. med. Otto Hug, Professor für Strahlenbiologie, und seiner Frau Else, geborene Stock, Konzertpianistin.

1966 - 1970 Volksschule an der Schwanthalerstraße, München

1970 - 1979 Humanistisches Theresien-Gymnasium, München

1979 Abitur

1979 - 1986 Studium der Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität, München

1981 - 1986 Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen
Volkes

3./4. 1981 Studienaufenthalt an der Columbia-University,
New York, U.S.A.

1984 Gastsemester an der Harvard-University, Boston,
U.S.A.

1983 - 1986 Doktorarbeit im Laboratorium Professor Dr. med.
E. Erdmann an der Medizinischen Klinik I der
Ludwig-Maximilians-Universität, München,
Direktor: Professor Dr. med. Gerhard Riecker

1986 Staatsexamen und Approbation

Viele Hinweise, Anregungen und Gespräche haben diese Arbeit entscheidend geprägt.

Hierfür danke ich meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Erland Erdmann und meinem Freund und wissenschaftlichen Betreuer, Herrn Dr. Lindsay Brown.

Mein Dank gilt gleichfalls Frau Hannelore Reithmann und Fräulein Anita Reichl für die liebenswürdige, labortechnische Unterstützung, sowie Herrn Martin Rupff für das Anfertigen der Zeichnungen.

